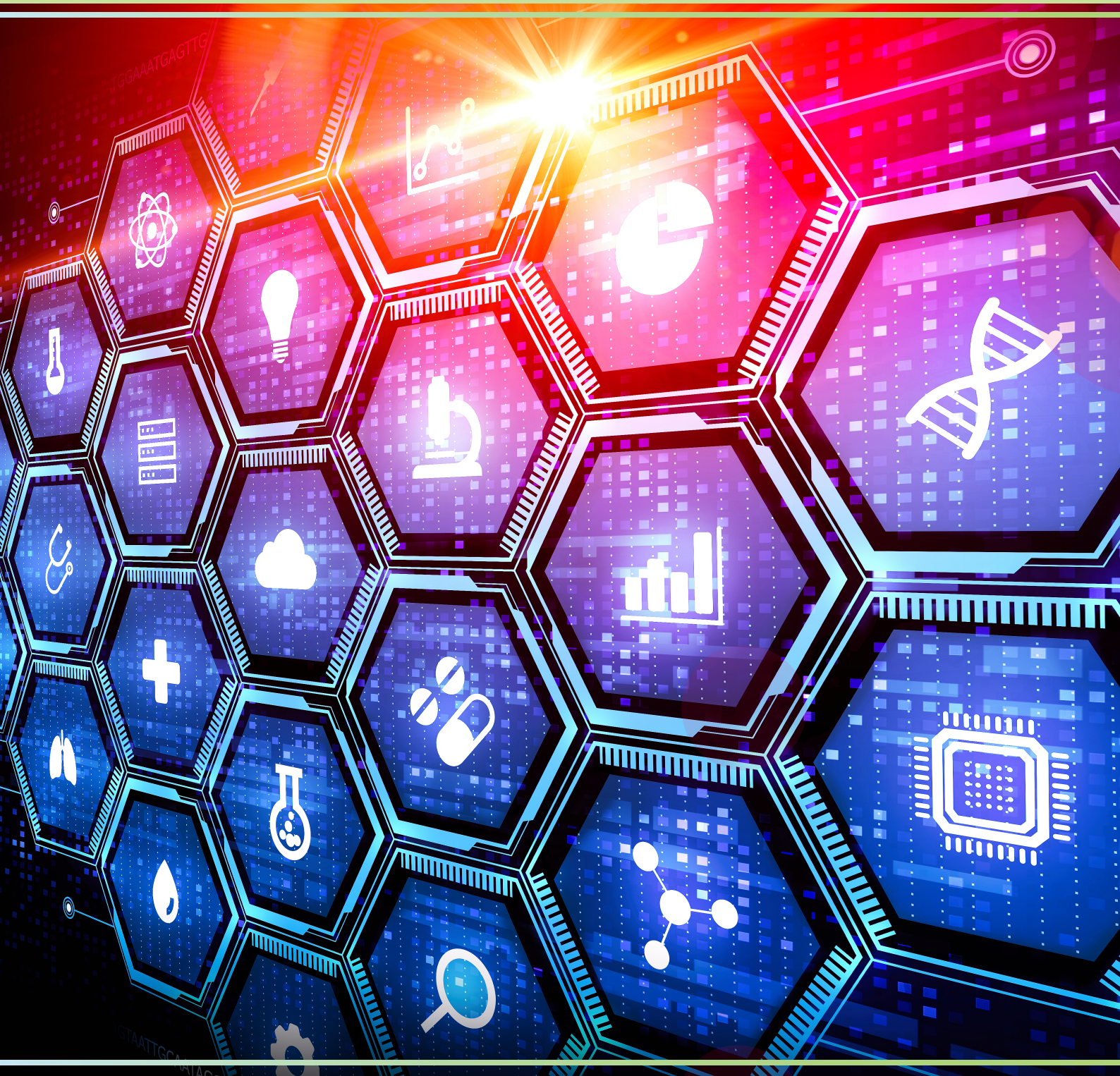
FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

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



Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers

Volumen XXXIII

Índice

Subsidios 2018 - 2020

PERCEPCIÓN SOBRE LAS VACUNAS EN CÓRDOBA
M. P. Adamo, M. M. Sepich, B. Prado, M. B. Colazo Salbetti, M. Pedranti, S. Trucchia. p. 13

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO SABETHES (CULICIDAE), VECTORES DE FIEBRE AMARILLA SELVÁTICA, COLECTADOS EN LAS PROVINCIAS DE MISIONES Y CORRIENTES
C. N. Alvarez, A. C. Alonso, M. Stein. p. 31

RELACIÓN ENTRE LEPTINA MATERNA Y GANANCIA DE PESO INFANTIL EN LOS PRIMEROS SEIS MESES DE LACTANCIA. IMPORTANCIA DE LA OBESIDAD MATERNA. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN CÉLULAS SANGUÍNEAS
M. F. Andreoli. p. 39

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA 37 COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE LA AGRESIVIDAD AUTOINMUNE EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 1
L. Andreone, F. Fuertes, P. Rodríguez, G. Eiberman, M. D. Torres Guevara, F. Palacios Porta, J. Szurpik, M. J. Perone. p. 63

INFECCIÓN POR DENGUE
P. Baré, G. Carballo, S. Espíndola, N. Aloisi, M. M. E. de Bracco, R. Chuit. p. 73

ESTABLECIMIENTO DE MARCADORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS EN NIÑOS EN SITUACIÓN DE INSEGURIDAD SOCIOECONÓMICA
B. G. Berardino. p. 87

RIESGO POTENCIAL DE TROMBOCITOPENIA FETAL/NEONATAL ALOINMUNE ASOCIADO A GENOTIPOS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS DE BAJA FRECUENCIA EN MUJERES EMBARAZADAS EN CÓRDOBA
S. Blanco, L. C. Vega, J. M. Culasso, L. H. Carrizo, S. V. Gallego. p. 95

DETECCIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES Y ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN ESPACIOS VERDES DE RECREACIÓN INFANTIL
X. Blanco Crivelli. p. 111

ESTUDIO PRELIMINAR DE ADAPTACIÓN TRANSCULTURAL DE LA ESCALA DE EVALUACIÓN DEL DESARROLLO INFANTIL BAYLEY III EN BUENOS AIRES, ARGENTINA
V. Bokser. p. 123

USO DEL TRABECULAR BONE SCORE (TBS) PARA LA DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL RIESGO DE FRACTURAS VERTEBRALES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA
M. L. Brance, B. A. Pons-Estel, N. J. Quagliato, M. Jorfen, G. Berbotto, M. Palatnik, J. Percudani, N. L. Meneses, A. Razzini, J. Miljevic, P. Rubio, L. R. Brun. p. 147

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEISHMANIA BRASILIENSIS Y LEISHMANIA INFANTUM MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL GEN HSP70 Y POSTERIOR RFLP, EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE LEISHMANIA SPP. DE LA REGIÓN NEA
B. L. Brusés, R. H. Lucero, L. B. Formichelli. p. 154

TRANSMISIÓN MATERNO-INFANTIL DE TRYPANOSOMA CRUZI: BÚSQUEDA DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS EN MUJERES EMBARAZADAS CON INFECCIÓN CRÓNICA, PREDICTIVOS DEL RIESGO DE INFECCIÓN CONGÉNITA
P. L. Bustos, J. Bua, A. Perrone, N. Milduberger. p. 163

CORONAVIRUS y METAPNEUMOVIRUS HUMANOS AUTÓCTONOS: ANÁLISIS MOLECULAR y CLÁSICO, CLÍNICA y EPIDEMIOLOGÍA EN PACIENTES DE CÓRDOBA
A. Cámara. p. 168

DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE SALUD EN LA LOCALIDAD DE RAWSON, PARTIDO DE CHACABUCO, PROV. DE BUENOS AIRES
R. Chuit. p. 178

EL GÉNERO BORRELIA EN ESPECIES DE GARRAPATAS CON IMPORTANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA EN ARGENTINA
G. L. Cicuttin. p. 193

ESTUDIO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO Y CHLAMYDIA TRACHOMATIS PARA PACIENTES CON LESIONES ORALES Y ANOGENITALES, ASISTIDOS EN DOS HOSPITALES PUBLICOS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA
C. Cuffini, D. David, O. Rosato, C. Marson, R. Ferreyra de Prato, R. Tomasi, P. Pizarro. p. 201

ESTUDIO DE MECANISMOS RESPONSABLES DE CAMBIOS FENOTÍPICOS DE FIBROBLASTOS SINOVIALES EN ARTROPATÍAS CRÓNICAS
M. S. Di Genaro, R. Blas, A. Munarriz, R. Pardo-Hidalgo, H. Tamashiro. p. 213

ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C A LOS ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA IN VITRO E IN VIVO Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN ARGENTINA
F. A. Di Lello. p. 234

METADONA COMO PRIMERA LÍNEA DE TRATAMIENTO DEL DOLOR POR CÁNCER. ANÁLISIS DEL PERIODO DE TITULACIÓN
G. Dran. p. 241

ESTUDIOS GENÉTICO MOLECULARES EN ATAXIA DE FRIEDREICH
L. D. Espeche, I. H. Castro, L. Dain, J. Santos. p. 256

ROL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE ADN EN LA PATOGÉNESIS DE LA SINOVITIS CRÓNICA EN PACIENTES CON HEMOFILIA TRATADOS CON PRP
J. Etulain. p. 266

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES GENÉTICAS EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR EN ARGENTINA
A. F. Fundia, J. A. Mazzei, M. B. Fontecha, R. Anadón. p. 293

ESTUDIO DE MARCADORES TUMORALES Y DEL MICROAMBIENTE POTENCIALMENTE ASOCIADOS A LA QUIMIORRESISTENCIA DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL
C. Gentili, A. O. Zwenger, H. V. Maturi, L. Gómez, N. Calvo, G. Gigola, M. J. Martín, M. B. Novoa Díaz, P. M. Carriere. p. 300

DETERMINACIÓN DE PUNTOS DE CORTE EPIDEMIOLÓGICOS DE MALASSEZIA FURFUR, MALASSEZIA SYMPODIALIS Y MALASSEZIA GLOBOSA FRENTE AL FLUCONAZOL, ITRACONAZOL, VORICONAZOL Y ANFOTERICINA B
G. Giusiano, F. Rojas, M. de los Á. Sosa, W. Latorre, J. Mussin, L. Alegre. p. 309

DETECCIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN EMBARAZADAS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA
A. X. Kiguen, C. Cuffini, F. Venezuela, M. Marramá, J. Mosmann, P. Estofan, S. Ruiz. p. 320

RELEVANCIA DEL MICROBIOMA EN EL TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
V. Labovsky , L. Dandeu, S. Sidlik, A. Penas-Steinhardt, J. Lachovski, P. Marenco, M. del P. Carballo , M. F. Alsina, M. P. Vázquez, A. Wernicke, N. A. Chasseing. p. 327

EVALUACIÓN DEL APORTE DEL AGUA DE BEBIDA A LA INGESTA DIARIA DE CALCIO EN LA REPÚBLICA ARGENTINA
M. Lombarte, M. E. Chulibert, M. Lupo, A. Rigalli. p. 342

EFECTOS GENÓMICOS Y NO-GENÓMICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: INTERACCIÓN CON HORMONAS SEXUALES ESTEROIDEAS
C. M. López Fontana. p. 351

PERFIL DE SENSIBILIDAD/RESISTENCIA FRENTE A COLISTINA, FOSFOMICINA Y TIGECICLINA EN AISLAMIENTOS DE ENTEROBACTERIAS PROVENIENTES DE FUENTES DE AGUA DE LA PROVINCIA DEL CHACO, ARGENTINA
L. S. Lösch, L. A. Merino. p. 364

ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ZONAS EXPUESTAS A ARSÉNICO Y FLÚOR EN EL AGUA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA Y DETERMINACIÓN DEL TIPO DE AGUA (POZO, RED, ÓSMOSIS INVERSA, EMBOTELLADA, ETC.) QUE CONSUME LA POBLACIÓN
M. Lupo. p. 373

OBESIDAD INFANTIL Y RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA CALIDAD LIPOPROTEICA ASOCIADAS A INFLAMACIÓN Y RESISTENCIA INSULÍNICA
M. Martín, W. Tetzlaff, E. Botta, L. Boero, L. Gaete, L. Trifone, F. Brites. p. 381

EVALUACIÓN PILOTO DEL ESTADO DE SALUD DE DOS GRUPOS DE ADOLESCENTES DE ÁREAS RURALES A TRAVÉS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y BIOMARCADORES GENÉTICOS COMO APORTE AL ESTABLECIMIENTO DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE LA EXPOSICIÓN A AGROQUÍMICOS EN MENORES DE EDAD DE LA REPÚBLICA ARGENTINA
F. Martínez Perafán, M. López Nigro, M. A. Carballo. p. 394

SÍNDOME METABÓLICO Y ALTERACIONES DE LA FERTILIDAD FEMENINA Y PREÑEZ
G. F. Meresman. p. 408

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON SOBREPESO/OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON LAS ADIPOCITOQUINAS Y EL ESTADO INFLAMATORIO
T. Meroño, E. Alonso, L. Kabakian, M. P. Santucci, M. L. Muzzio. p. 413

PROCOPIN (PROGRAMA DE CONTROL DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES Y NUTRICIÓN) EN ESCOLARES DE VILLA CORBALÁN DE BERISSO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES
M. C. Minvielle, B. C. Pezzani, M. L. Ciarmela, A. B. Orden, M. Isla Larrain, J. Anabitarte, A. Nuñez, V. Durante, Bernal. p. 428

USO DEL GEN VH4-34 EN NEOPLASIAS B: DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA SU IDENTIFICACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO
P. E. Morande, A. Vereertbrugghen, A. Colado, E. Elias, M. Vergara Rubio, V. Sarapura Martínez, M. Amondarain, R. Bezares, H. Fernández Grecco, G. Cordini, M. Borge, R. Gamberale, M. Giordano. p. 440

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS ONICOMICOSIS POR DERMATOFITOS Y NO DERMATOFITOS EN UN ÁREA DE ALTA PREVALENCIA
J. E. Mussin. p. 447

EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA TIPO 1 EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: UN ESTUDIO EXPLORATORIO EN LA BASE DE DATOS PPMI
S. Pérez Lloret, L. Udovin, M. Otero-Losada, S. Bordet, G. Chevalier, C. Quarracino, F. Capani. p. 452

MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DURANTE LA INFECCION DE RHODNIUS PROLIXUS CON TRIPANOSOMÁTIDOS: COMO DETENER UNA ENFERMEDAD CONOCIENDO SU TRANSMISIÓN
A. Rolandelli, A. E. C. Nascimento, L. S. Silva, R. Rivera-Pomar, A. A. Guarneri. p. 461

PREVALENCIA Y CORRELACIÓN CLÍNICA DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO CONVENCIONALES EN PACIENTES CON SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO OBSTÉTRICO SERONEGATIVO
A. Sánchez-Luceros, M. F. Alberto, M. Asessio. p. 478

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES GENÓMICAS DE PD-L1/PD-L2 EN PACIENTES CON LINFOMA DE HODGKIN. VALOR PRONÓSTICO Y SIGNIFICADO CLÍNICO
I. Slavutsky, M. García Montenegro, M. Narbaitz, M. F. Metrebian, A. Pavlovsky. p. 492

DETERIORO COGNITIVO LEVE, RIESGO CARDIOVASCULAR Y BIOMARCADORES ASOCIADOS EN ADULTOS MAYORES DE UN ZONA RURAL DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN
A. G. Soria de González, L. M. Tefaha, R. S. Guber, Ad. Liatto de Nogalo, R. Toledo, F. F. Aragón, J. G. José, N. G. Sandoval, G. Vázquez Paez, D. M. Martínez, C. Maha, I. M. Garay. p. 504

IMPLICANCIAS CLÍNICAS DE LAS ESPECIES CRIPTICAS DE PARACOCCIDIOIDES
M. de los Á. Sosa. p. 520

DETERMINACIÓN DE UN PERFIL MOLECULAR DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA DEFICIENTE (HRD) COMO MARCADOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A DOXORRUBICINA EN CÁNCER DE MAMA
M. L. Sottile Fleury, L. Vargas Roig, L. C. Gómez, A. Redondo. p. 530

ANÁLISIS DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN IGHV, PRESENCIA DE RECEPTORES ESTEREOTIPADOS Y SUBCLONES DE VALOR PRONÓSTICO EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA
C. Stanganelli, J. Cabrera, M. Sarmiento. p. 543

VIRUS NEUROTRÓPICOS TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS (MOSQUITO BORNE VIRUS) EN LA PROVINCIA DE CHACO
O. S. Stechina, G. I. Oria, C. N. Álvarez, M. Stein. p. 554

EPIDEMIOLOGÍA DE MICROORGANISMOS RICKETTSIALES (RICKETTSIA, EHRLICHIA Y ANAPLASMA) ASOCIADOS A GARRAPATAS (ACARI: IXODIDAE) DE IMPORTANCIA SANITARIA EN ARGENTINA
E. L. Tarragona, G. L. Cicuttin, F. S. Flores, S. Nava. p. 562

BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN NIÑOS CON ENFERMEDAD CELÍACA. IMPACTO DE LA DIETA LIBRE DE GLUTEN
W. F. Tetzlaff, A. Bottero, E. E. Botta, L. Boero. p. 573

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE POLIOMAVIRUS HUMANOS CON TROPISMO CUTÁNEO EN ARGENTINA
C. Torres. p. 590

CROSSTALK ENTRE PLAQUETAS, B. ABORTUS Y CÉLULAS INMUNES: SU ROL EN LA INFECCIÓN Y LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS HUMANA
A. Trotta, A. M. Rodríguez, M. A. Milillo, A. Serafino, M. V. Delpino, G. Hernán Giambartolomei, P. Barrionuevo. p. 596

EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE TRICHINELLOSIS EN ALBERTI, PROVINCIA DE BUENOS AIRES
R. C. Zumpano. p. 605



ALBERTO J. ROEMMERS

1890 – 1974

FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

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

Presidente
Dr. Rodolfo F. Hess

Vicepresidente
Dr. Ángel Omar Scapin

Secretario
Dr. Julio A. Bellomo

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

Fiscalizadores
Dra. Adriana Mira
Dr. Mauricio A. Stortoni

INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2018 – 2020, se han volcado todos los informes finales de los grupos de investigación que desarrollaron sus tareas en ese lapso.

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

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

PERCEPCIÓN SOBRE LAS VACUNAS EN CÓRDOBA

María Pilar Adamo, Marlene Micaela Sepich, Benjamín Prado,
María Belén Colazo Salbetti, Mauro Pedranti, Silvina Trucchia

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", y Cátedra de Antropología,
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

INTRODUCCIÓN

Los programas de vacunación evitan entre 2 y 3 millones de muertes al año y se estima que si la cobertura mundial de vacunación mejorara, ese número se incrementaría en 1,5 a 2 millones, por lo que las vacunas son un componente esencial de la atención primaria de salud para reducir la morbilidad y la mortalidad, para el control y erradicación enfermedades y constituyen la intervención de salud preventiva con mejor costo-beneficio en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud 2019a). Con el establecimiento del Programa Ampliado de Inmunización en la década de 1970, la cobertura de vacunación aumentó de manera constante a lo largo de los años, llegando a más del 90% a principios del siglo XXI; en consecuencia, las enfermedades previamente prioritarias se hicieron cada vez menos frecuentes (Organización Mundial de la Salud 2013), sobre todo en los países desarrollados. Aparte de las manifestaciones de rechazo a las vacunas que existieron desde las primeras campañas de vacunación, la ausencia de enfermedades que antes eran comunes y ahora ya no se observan puede conducir a la gente a creer erróneamente que las vacunas no son necesarias (Andre et al., 2008). Sin embargo, es la aplicación sostenida de las vacunas la principal responsable de la ausencia de estas enfermedades. Por ello, organizaciones nacionales e internacionales de salud reconocen que la confianza pública en las vacunas es un tema de importancia principal.

La pérdida de confianza en las vacunas puede llevar a un retraso en su aceptación e incluso su rechazo, generando una baja cobertura y la exposición de la población al riesgo de brotes de enfermedades controladas. Esto desafía los objetivos de inmunoprevención tanto en entornos de ingresos altos como bajos, por lo que se recomienda monitorear la confianza en las vacunas para identificar preocupaciones emergentes antes de que se conviertan en crisis significativas.

El escenario mundial actual es heterogéneo y algunas personas manifiestan una renovada preocupación por la seguridad de las vacunas. Esta preocupación es impulsada por la información que se distribuye amplia y rápidamente por diferentes canales accesibles a través de Internet, incrementando dudas y causando controversias sobre las vacunas. La reticencia a las vacunas es un problema global y dinámico que requiere vigilancia (Larson et al 2018; Larson y Schulz 2019). Fue identificado por la OMS como una de las diez amenazas para la salud mundial en 2019 (Organización Mundial de la Salud 2019), ya que pone en peligro la inmunidad colectiva que han construido quienes están vacunados en una comunidad. Si la proporción de personas vacunadas disminuye, habrá menos inmunidad colectiva para proteger a quienes no pueden vacunarse y a quienes eligen no vacunarse. Aquí radica el problema, ya que para algunas enfermedades una pequeña

minoría que no se vacuna es suficiente para debilitar la protección comunitaria y permitir la ocurrencia de brotes. Por eso es tan importante para las agencias de salud no solo promover y garantizar el acceso global a las vacunas, sino también monitorear y mantener altos niveles de confianza y aceptación pública (Larson y Schulz 2019).

La OMS define la reticencia a las vacunas como un retraso en la aceptación o el rechazo de las vacunas a pesar de la disponibilidad de servicios de inmunización (MacDonald et al. 2015). Es un tema complejo, multidimensional y contextualizado, delimitado por factores como el grado de información, la complacencia, la conveniencia y la confianza. Abordarlo requiere conocer la magnitud y el escenario en el que se desarrolla, diagnosticar las raíces, diseñar estrategias para mitigar las causas, monitorear y evaluar las intervenciones para determinar su impacto y vigilar su posible recurrencia. Hay muchos factores determinantes de la reticencia a las vacunas, incluidos factores contextuales, grupales, individuales, específicos de una vacuna o relativos a la vacunación en general. Cada región debe identificar cuáles subyacen a la reticencia a nivel propio (Dubé et al. 2015; MacDonald et al. 2015).

En Argentina, la inmunización infantil se ha convertido en un programa mayor de vacunación familiar con 17 vacunas gratuitas y obligatorias al 2019 (BCG, hepatitis B, neumococo conjugado, quíntuple pentavalente, cuádruple, polio IPV, rotavirus, meningococo, influenza, hepatitis A, triple viral, varicela, triple bacteriana celular, triple bacteriana acelular, papiloma virus, doble bacteriana) más dos vacunas adicionales para zonas de riesgo, también gratuitas (fiebre hemorrágica argentina y fiebre amarilla) (Abate et al.2012; Ministerio de Salud (Argentina) 2020a). A este plan se suma actualmente la mayor campaña de vacunación de la historia, en el marco de la lucha frente a la pandemia de COVID-19. Sin embargo, la cobertura de vacunación para los patógenos históricos podría estar por debajo del nivel recomendado, tal como ya lo reportaba un estudio realizado entre trabajadores de atención primaria de la salud en la ciudad de Córdoba, con niveles de cobertura que alcanzaban el 50-68% según la vacuna (Acevedo et al. 2016). La Comisión Nacional de Inmunización también ha estimado que la cobertura de inmunización está por debajo del nivel recomendado en la población general (Bonvehí et al. 2017). Además, un estudio referido a cuidadores de niñas escolares en el litoral argentino mostró una intención de vacunar contra el VPH del 59% (Chaparro et al. 2020).

Conocer los factores que definen los sentimientos frente a las vacunas contribuirá a proponer y evaluar medidas para incrementar su aceptación y demanda. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue investigar la percepción local sobre las vacunas y la adherencia al calendario nacional de inmunizaciones, indagando en áreas urbana y rural de Córdoba, Argentina.

MÉTODOS

Diseño del estudio y consideraciones éticas.

Estudio observacional, descriptivo, analítico, de corte transversal. Se realizó mediante una encuesta estructurada, administrada con un cuestionario de respuestas abiertas y cerradas, entre octubre de 2018 y octubre de 2019. El tipo de muestreo fue no probabilístico por cuotas. El protocolo fue evaluado y aprobado por el CIEIS del Hospital Nacional de Clínicas (REPIS Nº 3411).

Participantes.

Personas mayores de edad habitantes de la Provincia de Córdoba, en la que se seleccionó una zona urbana (ciudad de Córdoba) y otra rural (Villa Yacanto de Calamuchita). Según los últimos datos oficiales disponibles al momento del diseño de este estudio, la ciudad de Córdoba tenía 1.329.604 habitantes (adultos: 71,6%) y el pueblo de Yacanto, 1.634 (adultos: 62,8%) [censo 2010, (INDEC, 2012; Gobierno de la Provincia de Córdoba, 2018)]. En Córdoba los participantes encuestados fueron reclutados en diversos puntos de la ciudad, incluyendo la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Córdoba, Parque Las Heras, salas de espera de centros de diagnóstico ambulatorios (LACE, DASPU), y otros centros educativos de nivel medio y terciario (IPEM 39, Escuela "Gobernador Emilio F. Olmos", Colegio Jesús María, Instituto Parroquial "Nuestra Señora de Loreto" e Instituto de Educación Superior Quality ISAD). En Yacanto se encuestó también en diversos puntos del pueblo: plaza central / predio ferial, escuela secundaria, sede administrativa municipal, zona comercial y barrios aledaños. Los participantes fueron invitados a responder la encuesta de manera voluntaria y anónima. Tamaño mínimo de la muestra "Córdoba" para un nivel de confianza del 95% y error del 5%: 383; tamaño mínimo de la muestra "Yacanto" para parámetros estadísticos similares: 280.

Instrumento de recolección de datos.

El cuestionario utilizado en la encuesta es una versión traducida al idioma español y adaptada localmente a partir de la versión original en inglés, que fue elaborada y estandarizada por el Grupo Estratégico de Consejeros Expertos en Inmunizaciones (Strategic Advisory Group of Experts, SAGE) de la OMS (Larson et al., 2015; WHO SAGE, 2016). Dicho cuestionario traducido y adaptado fue validado in situ, en grupos de 10 a 20 participantes, resultando definitiva la versión 1.4 (Anexo I). Luego del proceso de validación, el cuestionario fue administrado por el encuestador en todos los casos excepto en aquellos en los que se entregó en aulas, en los que fue autoadministrado.

Análisis de datos.

Los datos recabados con el cuestionario fueron tabulados en una planilla de datos. A partir de esta base se obtuvieron y describieron resultados usando porcentajes, intervalos de confianza del 95%, medidas de tendencia central y dispersión. Se utilizaron pruebas estadísticas ($\chi 2$, Student) para contrastes y comparaciones del programa Infostat versión libre 2019.

RESULTADOS

La encuesta incluyó un total de 1415 participantes (Tabla 1). La muestra de Córdoba quedó constituida por 1112 adultos (margen de error del 2,9%) con una edad mediana de 26 años, 67% de la misma de sexo femenino, 82% con estudios superiores y 31% con hijos / menores a cargo. De la encuesta realizada en Yacanto quedaron incluidos 303 cuestionarios (error 4,7%) y entre estos participantes la edad mediana fue 38 años, 72% fueron mujeres, 32% con estudios superiores y 87% con hijos (OR 14, IC95% 10-20).

Tabla 1. Características demográficas de las muestras.				
Muestra		Córdoba	Yacanto	p
n		1112	303	
Edad	Promedio (IC95%) Mediana (IC95%) Moda	32 ± 14 (IC 95%: 31-33) 26 (IC 95%: 25-27) 18	39 ± 12 (IC 95%: 37-40) 38 (IC 95%: 36-40) 38	<0,0001
Distribución por sexo	Masculino Femenino	372 (33%) 740 (67%)	84 (28%) 219 (72%)	0,067
Estudios	Primarios Secundarios Terciarios/universitarios Sin datos	34 (3%) 169 (15%) 906 (82%) 3 (0,3%)	64 (21%) 139 (46%) 98 (32%) 2 (1%)	<0,0001
Hijos	Sí No	348 (31%) 764 (69%)	261 (87%) 42 (13%)	<0,0001

En la tabla 2 se resumen las respuestas sobre percepción general acerca de las vacunas (preguntas 1 a 4 de la encuesta).

Tabla 2. Respuestas a las preguntas introductorias de la encuesta (1 a 4).				
Pregunta	Respuesta	Córdoba	Yacanto	p
1. ¿Cree que las vacunas pueden proteger a los niños de enfermedades graves?	Sí	99% (1098/1112)	91% (275/303)	<0,0001
2. ¿Cree que los padres vacunan a sus niños con todas las vacunas recomendadas?	Todos	3% (35/1112)	11% (33/303)	<0,0001
	La mayoría	71% (786/1112)	73% (221/303)	0,1398
	Algunos	26% (291/1112)	16% (49/303)	0,0008
3. ¿Alguna vez tuvo dudas o desconfianza sobre vacunarse o vacunar a sus hijos?	Sí	17% (190/1112)	23% (69/303)	0,02
4. ¿Alguna vez ha rechazado alguna vacuna indicada?	Sí	10% (108/1112)	9% (26/303)	0,57

La figura 1 muestra la reticencia a las vacunas del calendario nacional. Tanto en Córdoba como en Yacanto, individualmente las más cuestionadas son las vacunas contra influenza y el virus papiloma humano; en Yacanto, la respuesta con mayor frecuencia en la categoría “dudas o desconfianza” fue “todas en general”. Las razones más frecuentes de reticencia fueron preocupación por la seguridad o efectos adversos (33% [98/298] en Córdoba y 44% [42/95] en Yacanto, p=0,09), haber escuchado o leído comentarios negativos (20% [60/298] y 32% [30/95], respectivamente, p=0,01) y pensar que una vacuna no es necesaria (27% [80/298] y 21% [20/95], respectivamente, p=0,29), entre otras (Fig. 2). Por otra parte, al indagar acerca de otros posibles motivos que hubieran existido para no vacunarse en tiempo y forma, el olvido fue el más frecuente en Córdoba (13%, 141/1112); en Yacanto se mencionaron varios pero en baja frecuencia (Fig. 3).

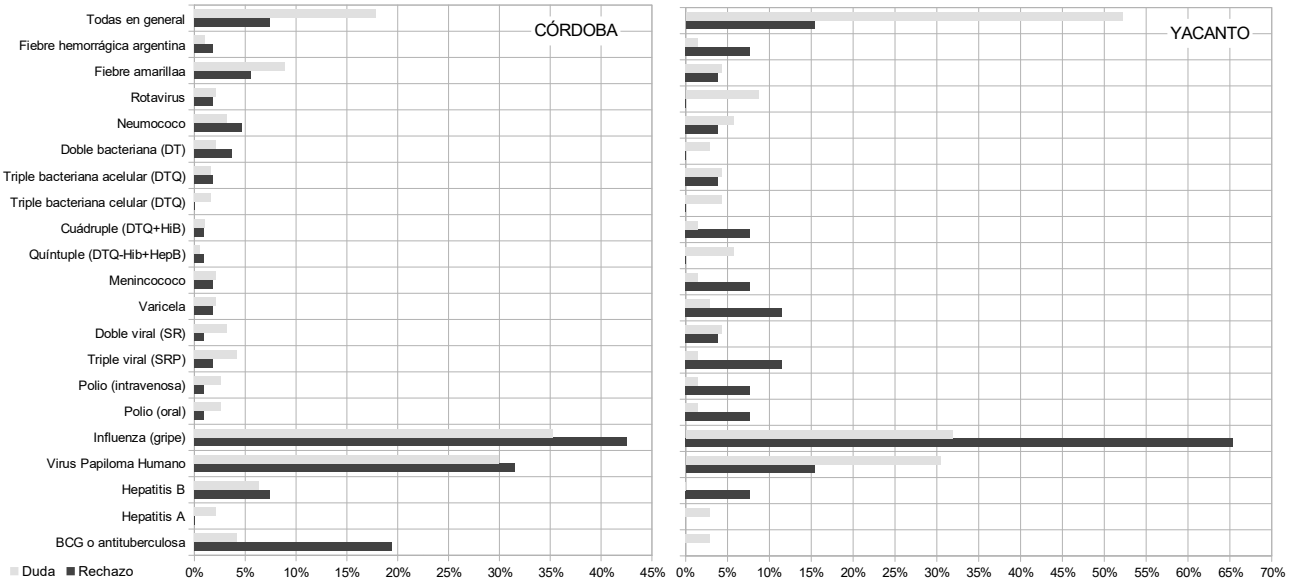


Fig. 1. Vacunas del Calendario Nacional de Inmunizaciones más cuestionadas (duda o desconfianza y rechazo) en Córdoba y Yacanto. DT: difteria y tétanos; DTP: difteria, tétanos y coqueluche; HiB: Haemophilus influenzae tipo B; MMR: triple viral (sarampión, rubéola, paperas); MR: doble (sarampión y rubéola); FLU: antigripal / influenza.

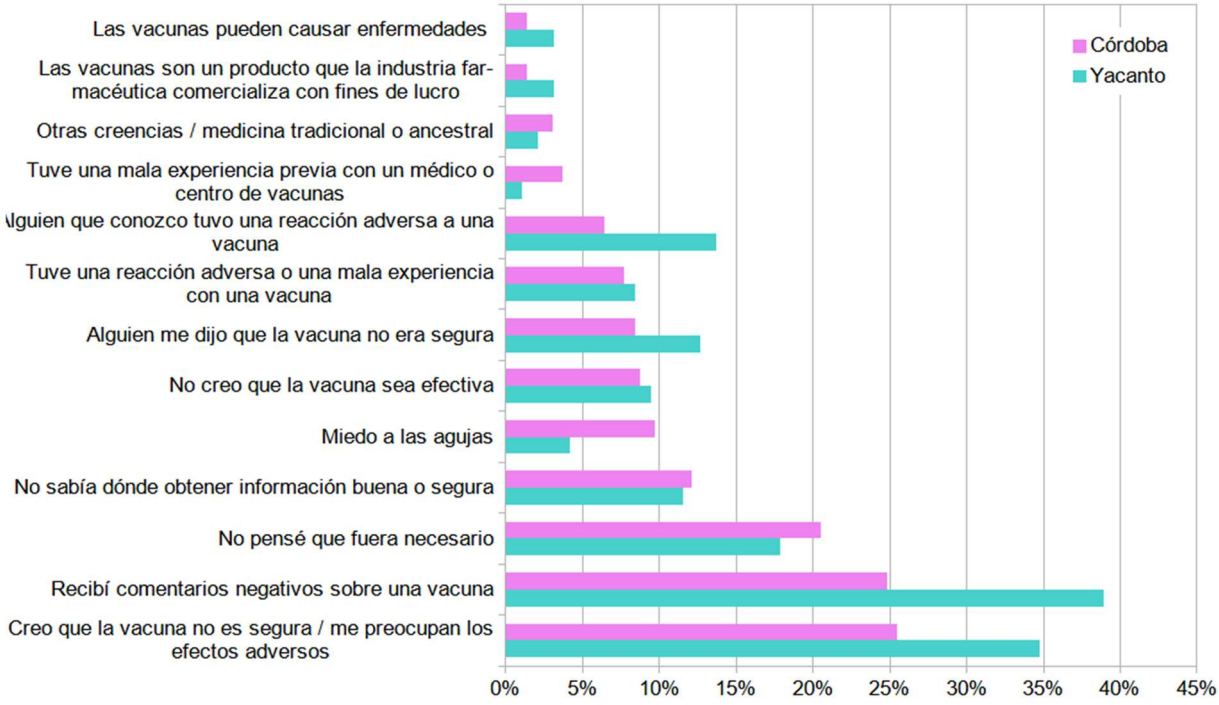


Fig. 2. Razones de duda y/o rechazo a las vacunas en Córdoba y Yacanto.

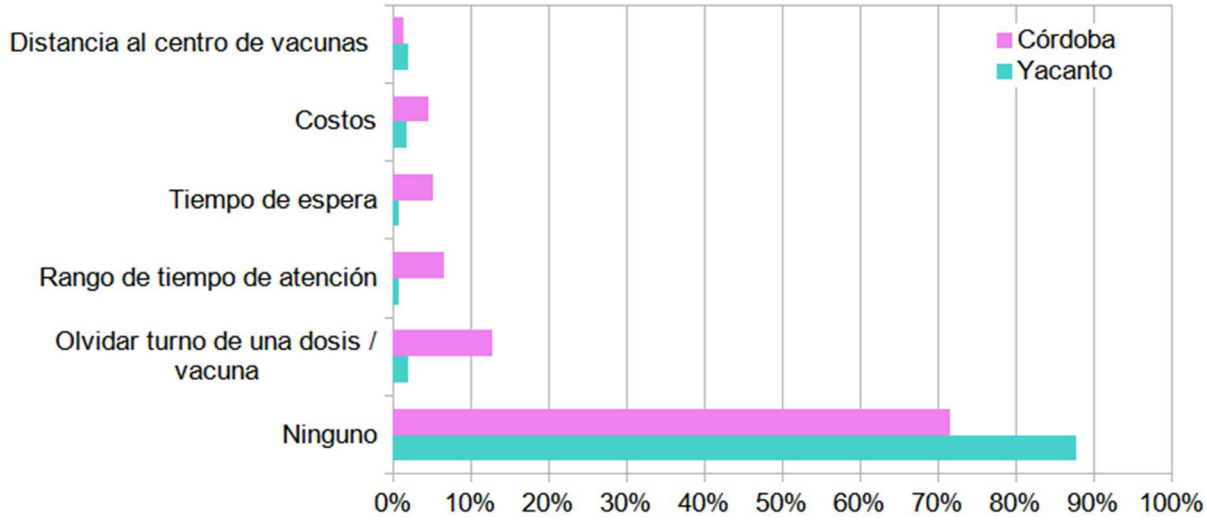


Fig. 3. Otros motivos para no vacunarse (diferentes a los de reticencia a las vacunas) mencionados por los participantes.

Coincidiendo con los datos de la tabla 2, 2% (26/1112) de los encuestados de Córdoba manifestó tener alguna razón para pensar que los niños no deben ser vacunados mientras que en Yacanto, 10% (31/303) [p<0,0001].

El 50% (554/1112) de los participantes de Córdoba y el 18% (54/303) en Yacanto (p<0,00001) consideró que es difícil para algunas personas de la comunidad tener acceso a las vacunas, expresando como motivos predominantes falta de inclusión (75%, 414/554), falta de información (14%, 75/554) y no sentirse bienvenido en servicio de salud (13%, 70/554) en Córdoba; en Yacanto los principales motivos expresados fueron la distancia al vacunatorio (50%, 27/50), costos elevados (17%, 9/50) y falta de insumos en el centro de salud (15%, 8/50) (Fig. 4).

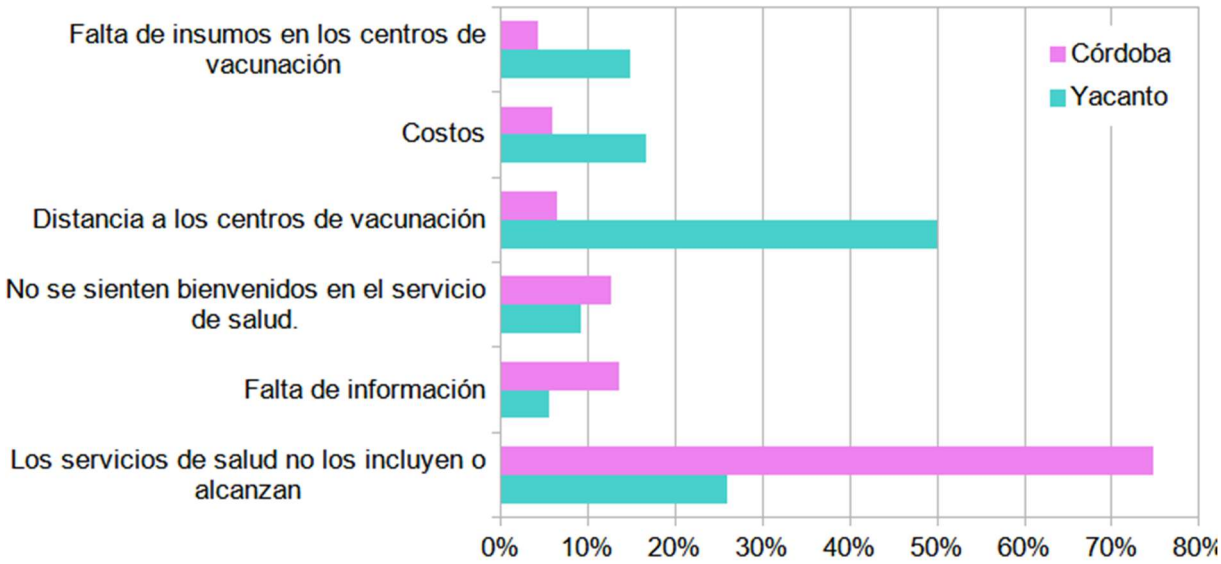


Fig. 4. Razones por las que los participantes de la encuesta consideran difícil el acceso a las vacunas para algunos miembros de su comunidad.

En Córdoba el 57% (636/1112) de los participantes manifestó haber recibido u oído información negativa acerca de las vacunas y en Yacanto, el 38% (115/303); de ellos, 8% (52/636) y 24% (28/115) ($p<0,00001$), respectivamente, cambiaron de opinión acerca de vacunarse o vacunar a sus hijos con esa información. Los ejemplos de información o comentarios negativos sobre las vacunas que los participantes más frecuentemente citaron fueron aludían a que "las vacunas enferman, infectan, diseminan u ocasionan más enfermedades, son contraproducentes, y/o dañan" (Córdoba 22% [138/636], Yacanto 29% [33/115]), "causan reacciones adversas, no son seguras" (Córdoba 12% [78/636], Yacanto 18% [21/115]), "contienen componentes nocivos como metales pesados" (Córdoba 3% [18/636], Yacanto 15% [17/115]), "son ineficientes, no son beneficiosas ni efectivas" (Córdoba 9% [55/636], Yacanto 11% [13/115]) y "causan autismo" (Córdoba 13% [80/636], Yacanto 1% [1/115]), entre otros (Fig. 5).

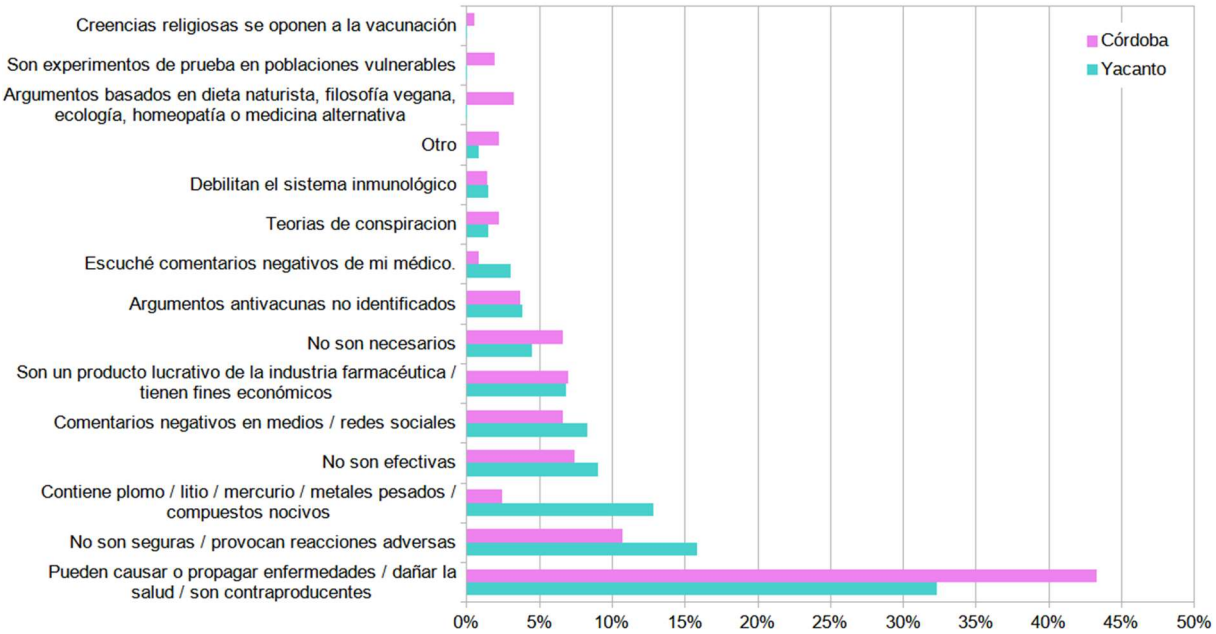


Fig. 5. Ejemplos de información negativa sobre las vacunas que han leído o escuchado los encuestados en Córdoba y Yacanto.

Por otro lado, en Córdoba 27% (305/1112) manifestó no saber si los referentes de la comunidad (líderes políticos, religiosos, maestros o médicos) apoyan las vacunas para bebés y niños, mientras que en Yacanto 13% (39/303) se expresó en este sentido ($p<0,0001$).

La Fig. 6 resume los resultados respecto a afirmaciones referidas a la vacunación que complementan las preguntas anteriores. En ambas localidades la mayoría de los participantes cree que "las vacunas de la niñez son importantes para la salud de los niños" (98% [1085/1112] y 92% [276/303] en Córdoba y Yacanto, respectivamente), que representan "una buena manera de proteger a los niños de las enfermedades" (96% [1066/1112] en Córdoba y 90% [272/303] en Yacanto) y que "generalmente sigue las recomendaciones de su doctor sobre las vacunas" (92% [1017/1112] en Córdoba y 93% [281/303] en Yacanto). Sin embargo, 8% (94/1112) en Córdoba y 15% (45/303) en Yacanto manifestaron dudas sobre la efectividad de las vacunas y 4% (46/1112) y 11% (33/303), respectivamente, no consideran que vacunarse es importante para la salud de

otros en su comunidad. En Córdoba el 24% (267/1112) expresó que tiene dudas sobre el beneficio de las vacunas para niños que el gobierno ha incluido en el calendario nacional de inmunizaciones y en Yacanto, el 19% (57/303). Además, 11% (126/1112) y 16% (49/303) de los encuestados en Córdoba y Yacanto, respectivamente, manifestaron incertidumbre acerca de la información recibida sobre las vacunas por los responsables de los programas de vacunación. Asimismo, una alta proporción en la muestra no piensa que los niños aún necesitan vacunas para enfermedades que ya no son comunes, tales como polio, sarampión o rubéola (19% [207/1112] en Córdoba y 26 % [78/303] en Yacanto, p=0,009), y tiene preocupación por los efectos adversos de las vacunas (29% [320/1112] en Córdoba y 39% [118/303] en Yacanto).

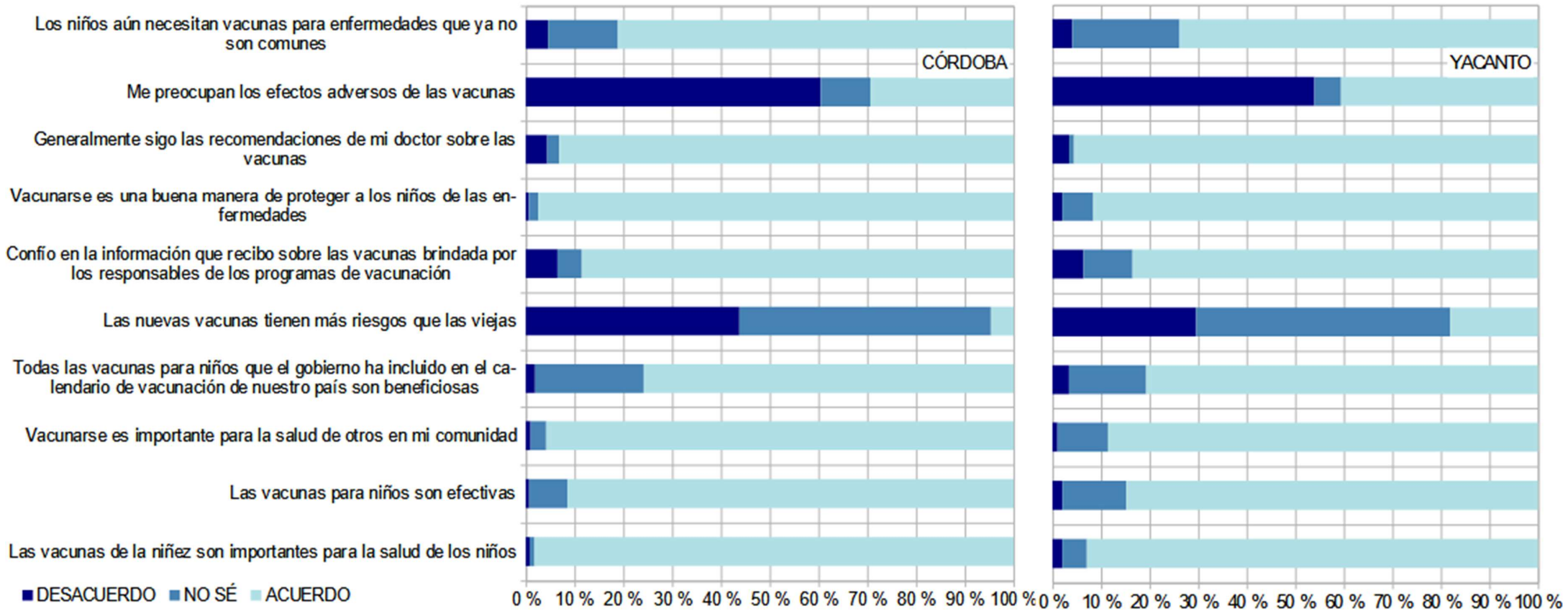


Fig. 6. Creencias generales o percepción sobre aspectos de las vacunas y programas de vacunación en Córdoba y Yacanto.

En la última parte de la encuesta se indagó con respecto al carnet de inmunizaciones. Una alta proporción de los adultos en Córdoba y en Yacanto reconoció no tener carnet de inmunizaciones ni cobertura completa (Fig. 7). Pero esta situación cambia cuando se refiere a los menores de edad. En este caso, 93% (325/348) de los participantes de Córdoba manifestaron que los menores a cargo tienen carnet de inmunizaciones y 92% (241/261) en Yacanto. Además, sólo alrededor de 5% (14/348 en Córdoba y 12/261 en Yacanto) de los participantes reporta que los niños no tienen el carnet completo para la edad (Fig. 7).

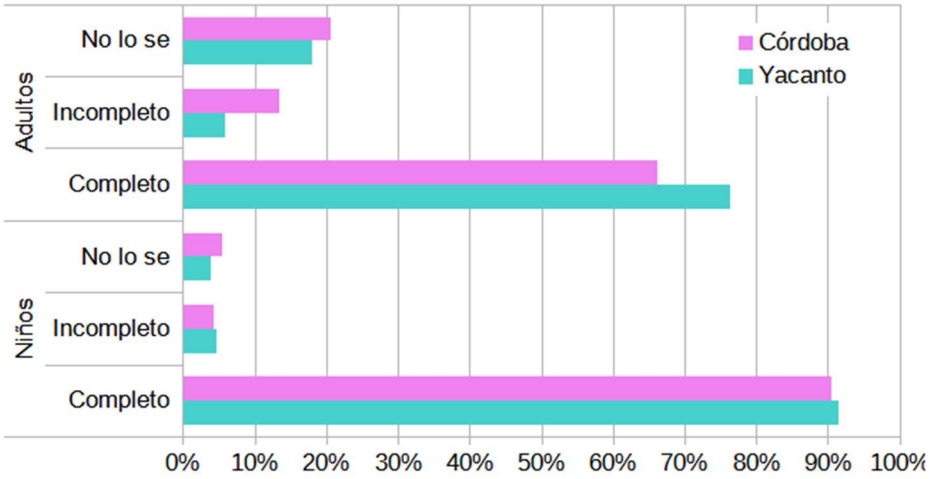


Fig. 7. Estado del carnet de inmunizaciones de los encuestados y de los hijos o menores a cargo en Córdoba y Yacanto.

Se realizó una comparación de datos categorizados según los siguientes criterios: rango de edad de los participantes, sexo, hijos o menores a cargo y campo de ocupación (Tabla 3). Los resultados significativos que se desprenden de este análisis son los siguientes: menor proporción en todos los grupos etarios cree que las vacunas pueden proteger a los niños de enfermedades graves en Yacanto que en Córdoba. Mayor proporción de participantes con niños y no trabajadores de la salud expresan dudas o desconfianza en vacunarse o vacunar a sus hijos en Yacanto que en Córdoba, pero se observó una mayor frecuencia de rechazo a una vacuna indicada entre los participantes más jóvenes y los participantes sin niños en Córdoba que Yacanto. Mayor proporción en Yacanto que en Córdoba (en todos los grupos etarios) cree que los niños no deben vacunarse, incluidos los participantes con niños. En Córdoba recibieron información negativa sobre las vacunas con más frecuencia (excepto trabajadores de la salud), pero mayor proporción en Yacanto cambió de opinión sobre de vacunarse o vacunar a sus hijos. Entre los habitantes de Yacanto hubo menos conciencia sobre la importancia de la vacunación para la salud de los otros en la comunidad, así como más preocupación por los riesgos de las nuevas vacunas y los efectos adversos relacionados con las vacunas en general. Finalmente, menos participantes en Yacanto consideran que los niños aún necesitan vacunas para enfermedades controladas.

Tabla 3. Comparación según rango etario, sexo, hijos / menores a cargo y campo de ocupación de los participantes en Córdoba y Yacanto.

		Rango de edad (años)						Sexo				Niños o menores a cargo				Campo de ocupación			
		18-30		31-45		46-		M		F		Sí		No		Salud		Otro	
		YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA	YAC	CBA
Cree que las vacunas de la niñez pueden proteger a los niños de enfermedades graves.	Frecuencia	70/76	670/677	136/147	250/252	69/78	178/183	77/84	366/372	198/217	732/740	238/261	342/348	37/40	756/764	6/6	343/345	269/295	755/767
	%	92	99	93	99	88	97	92	98	91	99	91	98	93	99	100	99	91	98
	p	<0,0001		0,0003		0,004		0,001		<0,0001		<0,0001		0,001		0,852		<0,0001	
Alguna vez ha tenido dudas o desconfianza acerca de vacunarse o vacunar a sus hijos	Frecuencia	11/76	107/677	38/147	50/252	20/78	33/183	14/84	46/372	55/217	144/740	65/261	56/348	4/40	134/764	0/6	55/345	69/295	135/767
	%	14	16	26	20	26	18	17	12	25	19	25	16	10	18	0	16	23	18
	p	0,762		0,163		0,162		0,292		0,060		0,007		0,218		0,287		0,032	
Alguna vez rechazó una vacuna indicada	Frecuencia	1/76	69/677	15/147	18/252	10/78	21/183	6/84	28/372	20/217	80/740	26/261	25/348	0/40	83/764	0/6	34/345	26/295	74/767
	%	1	10	10	7	13	11	7	8	9	11	10	7	0	11	0	10	9	10
	p	0,012		0,284		0,759		0,904		0,500		0,221		0,028		0,418		0,677	
Tiene alguna razón para pensar que los niños no tienen que estar vacunados.	Frecuencia	6/76	14/677	13/147	7/252	12/78	5/183	12/84	9/372	19/217	17/740	29/261	10/348	2/40	16/764	0/6	2/345	31/295	24/767
	%	8	2	9	3	15	3	14	2	9	2	11	3	5	2	0	1	11	3
	p	0,003		0,007		0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,226		0,852		<0,0001	
Ha recibido u oído alguna vez información negativa sobre las vacunas.	Frecuencia	24/76	387/677	52/147	147/252	39/78	103/183	33/84	196/372	82/217	441/740	99/261	187/348	16/40	450/764	3/6	210/345	112/295	427/767
	%	32	57	35	58	50	56	39	53	38	60	38	54	40	59	50	61	38	56
	p	< 0,0001		< 0,0001		0,351		0,027		<0,0001		0,0001		0,018		0,589		<0,0001	
Con esa información, cambiaron de opinión acerca de vacunarse o vacunar a sus hijos.	Frecuencia	3/24	40/387	17/52	14/147	8/39	10/103	7/33	16/196	21/82	48/441	27/99	20/187	1/16	44/450	0/6	13/345	28/295	51/767
	%	13	10	33	10	21	10	21	8	26	11	27	11	6	10	0	4	9	7
	p	0,737		0,0001		0,084		0,021		0,0003		0,0003		0,639		0,657		0,001	
Cree que vacunarse es importante para la salud de otras personas en mi comunidad.	Frecuencia	68/76	637/677	128/147	243/252	60/78	172/183	69/84	344/372	187/217	708/740	218/261	336/348	38/40	716/764	6/6	336/345	250/295	716/767
	%	89	94	87	96	77	94	82	92	86	96	84	97	95	94	100	97	85	93
	p	0,118		0,0004		0,0001		0,003		< 0,0001		< 0,0001		0,743		0,689		<0,0001	
Cree que las nuevas vacunas conllevan más riesgos que las viejas	Frecuencia	8/76	26/677	26/147	11/252	19/78	14/183	12/84	22/372	41/217	29/740	51/261	21/348	2/40	30/764	0/6	12/345	53/295	39/767
	%	11	4	18	4	24	8	14	6	19	4	20	6	5	4	0	3	18	5
	p	0,008		<0,0001		0,0002		0,008		<0,0001		<0,0001		0,735		0,642		< 0,0001	
Confía en la información recibida sobre vacunas proporcionada por los responsables de los programas de vacunación.	Frecuencia	68/76	579/677	122/147	225/252	58/78	163/183	63/84	319/372	185/217	648/740	211/261	321/348	37/40	646/764	6/6	309/345	242/295	658/767
	%	89	86	83	89	74	89	75	86	85	88	81	92	93	85	100	90	82	86
	p	0,348		0,072		0,003		0,016		0,372		<0,0001		0,171		0,404		0,127	
Están preocupados por los efectos adversos de las vacunas.	Frecuencia	21/76	201/677	67/147	64/252	30/78	55/183	25/84	86/372	93/217	234/740	108/261	96/348	10/40	224/764	0/6	106/345	118/295	214/767
	%	28	30	46	25	38	30	30	23	43	32	41	28	25	29	0	31	40	28
	p	0,709		<0,0001		0,185		0,200		0,002		0,0004		0,558		0,104		0,0001	
Creen que los niños todavía necesitan vacunas para enfermedades que ya no son comunes	Frecuencia	47/76	518/677	109/147	211/252	61/78	159/183	49/84	284/372	168/217	604/740	191/261	301/348	26/40	587/764	5/6	287/345	212/295	601/767
	%	62	77	74	84	78	87	58	76	77	82	73	86	65	77	83	83	72	78
	p	0,005		0,021		0,078		0,001		0,168		<0,0001		0,087		0,993		0,025	
Tienen carnet de vacunación	Frecuencia	60/76	578/677	91/147	205/252	40/78	113/183	42/84	275/372	149/217	621/740	159/261	261/348	32/40	635/764	6/6	297/345	185/295	599/767
	%	79	85	62	81	51	62	50	74	69	84	61	75	80	83	100	86	63	78
	p	0,140		<0,0001		0,116		<0,0001		<0,0001		0,0002		0,610		0,325		<0,0001	
Canet completo (participante)	Frecuencia	63/76	440/677	109/147	170/252	52/78	114/183	54/84	214/372	170/217	510/740	191/261	241/348	33/40	483/764	6/6	235/345	218/295	489/767
	%	83	65	74	67	67	62	64	58	78	69	73	69	83	63	100	68	74	64
	p	0,002		0,160		0,502		0,256		0,007		0,291		0,013		0,095		0,002	
Los niños tienen cartilla de vacunación	Frecuencia	42/42	33/34	131/141	152/154	68/78	140/160	64/68	78/85	177/193	247/263	240/261	323/348	-	-	3/3	32/34	237/258	291/314
	%	100	97	93	99	87	88	94	92	92	94	92	93	-	-	100	94	92	93
	p	0,211		0,012		0,944		0,490		0,362		0,690		-		0,666		0,716	
Cartilla completa (niños)	Frecuencia	41/42	31/34	129/141	142/154	64/78	128/160	58/68	74/85	176/193	227/263	233/261	299/348	-	-	3/3	27/34	230/258	272/314
	%	98	91	91	92	82	80	85	87	91	86	89	86	-	-	100	79	89	87
	p	0,136		0,822		0,707		0,882		0,108		0,218		-		0,383		0,360	

DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos la percepción y sentimientos locales sobre las vacunas comparando comunidades urbana y rural de la provincia de Córdoba, Argentina. En el área rural hubo una menor representación de participantes del segmento más joven y con estudios de tercer nivel, pero una mayor proporción de participantes con hijos. A nivel global, una alta proporción (>90%) en ambas comunidades cree en el potencial protector de las vacunas infantiles, sin embargo, la mayoría piensa que no todos los padres vacunan a sus hijos con todas las vacunas recomendadas en el calendario nacional de inmunizaciones. Alrededor del 20% de cada grupo expresó dudas o desconfianza sobre vacunarse o vacunar a sus hijos, lo que se tradujo en el rechazo de una vacuna indicada en aproximadamente la mitad de ellos. Las vacunas contra la gripe y el HPV se identificaron como las más controvertidas, pero en Yacanto la mitad de los participantes con dudas o desconfianza se refirieron a todas las vacunas en general. Las razones más frecuentes de reticencia fueron preocupaciones sobre la seguridad, los efectos adversos, haber escuchado o leído comentarios negativos y pensar que una vacuna no es necesaria. Otro motivo frecuente para no vacunarse oportunamente en Córdoba fue olvidarse de una dosis o vacuna correspondiente. Por otro lado, una gran proporción de los participantes considera que algunas personas tienen dificultades para acceder a las vacunas. En el área urbana esto se relaciona predominantemente a la falta de inclusión e información, mientras que en el área rural el motivo principal fue la distancia al centro de vacunación.

Alcances y fortalezas. Este estudio está limitado por el tipo de muestreo y por ello no es posible generalizar los resultados a toda la población. Sin embargo, dada la naturaleza exploratoria de la investigación, proporciona datos útiles para enfoques de profundización y futuras estrategias. La utilización del cuestionario estandarizado de SAGE-OMS, adaptado y validado, nos permite comparar nuestros datos con otros disponibles en la bibliografía global, y la inclusión de preguntas sobre el carnet de inmunización ha posibilitado estimar la adherencia al calendario de vacunación en las poblaciones estudiadas.

Implicaciones del estudio. Nuestros resultados muestran falta de confianza en la seguridad y relevancia de las vacunas en una proporción de la población, siendo este escenario similar al que se observa en otros países (Picchio et al. 2019; Rodríguez-Blanco y Tuells 2019; Hadjipanayis et al. 2020) y a nivel mundial en general, con un sentimiento negativo promedio sobre la seguridad de las vacunas del 13% (Larson et al. 2016). Las dudas predominantes sobre las vacunas contra la gripe y el VPH observadas aquí se relacionaron principalmente con la opinión pública sobre ellas. Comprender las razones para no vacunarse a nivel individual puede indicar formas en las que se podría mejorar la adherencia a la vacunación. Dado que un aspecto importante con respecto a la adherencia a las vacunas incluidas en nuestro calendario nacional de vacunaciones está relacionado con la información recibida tanto en las zonas urbanas como rurales, este factor podría abordarse mediante mejoras en las campañas de información a largo plazo, dirigidas a la población general pero también en el ámbito de las escuelas. Dos estudios realizados en Buenos Aires, referidos a la vacuna contra el HPV y la gripe, indican que este tema es un factor clave para abordar las bajas tasas de aceptación y demanda de vacunas. Un de ellos, de Arrossi et al. (2012) indagó acerca del conocimiento sobre HPV en la mayor área urbana de Argentina, luego de una campaña de información sobre la vacuna contra el HPV en medios masivos de comunicación, antes de que fuera incluida en el calendario nacional de inmunizaciones (en 2011). Esta encuesta reveló que menos del 40% de las mujeres conocían la vacuna y su uso para prevenir el cáncer de cuello uterino (Arrossi et al. 2012). El otro, mostró que el desconocimiento del programa de vacunación y no reconocer la necesidad de vacunar fueron principales motivos de esquemas incompletos y oportunidades perdidas de vacunación contra la gripe en lactantes en hospitales públicos de Buenos Aires y Córdoba (Gentile et al. 2015). Diferentes reportes en el mundo indican que esta situación es relevante a nivel global para estas dos vacunas específicas. En una revisión sistemática, por ejemplo, se ha demostrado que una de las principales barreras para la aceptación de la vacuna contra la gripe es la falta de conocimiento, entre otros determinantes psicológicos (Schmid et al. 2017). De manera similar, una encuesta en Suiza mostró que no vacunarse contra HPV frecuentemente se relaciona a no estar informado o suficientemente informado y los miedos a los efectos secundarios de la vacuna (Wymann et al. 2018). Por otra parte, la baja aceptación de las vacunas contra la gripe y el HPV en diferentes comunidades de Estados Unidos, no se ha asociado con barreras estructurales, socioeconómicas o relacionadas al sistema de salud, sino más bien con opiniones negativas y los posibles beneficios y daños percibidos de la vacuna (Bednarz et al.2020; Hennebery et al. 2020). Por lo tanto, es un tema importante para abordar y vigilar.

Más de la mitad en Córdoba y uno de cada tres en Yacanto recibieron información negativa sobre vacunas, pero la influencia negativa fue mayor en Yacanto que en Córdoba. Los participantes citaron ejemplos diversos de comentarios negativos sobre las vacunas y estos fueron generalmente similares en Córdoba y Yacanto, excepto que “las vacunas pueden causar o propagar enfermedades”, incluyendo “las vacunas causan

autismo", fueron más frecuentes en Córdoba. La referencia a la supuesta relación entre las vacunas y el autismo, que alude al actualmente desacreditado "informe Wakefield", podrían estar relacionados con un mayor acceso a contenidos de Internet en la localidad urbana. Teniendo en cuenta la gran afluencia de residentes que migran a zonas rurales como Yacanto desde los grandes centros urbanos, reforzar las campañas de información local en las escuela, centros vecinales y dependencias municipales, podría ayudar a mitigar la propagación de información falsa y la reticencia a las vacunas.

Algunas personas no perciben que los referentes de la comunidad apoyen las vacunas para niños, lo que indica otra área en la que trabajar para mejorar la confianza y la aceptación de las vacunas. Se ha reportado que los profesionales de la salud influyen en una actitud positiva y juegan un papel fundamental en la adherencia a las vacunas, con mayor aceptación entre los padres que se comunican con los médicos y reciben sus recomendaciones (Czajka et al. 2020; Jacobson et al. 2020) . En consecuencia, los trabajadores de la salud deben tomar un rol central en la planificación y ejecución de estrategias para impulsar la llegada de información de calidad a la población y así mejorar la confianza y aceptación de las vacunas. Las dudas o la falta de información sobre la seguridad y eficacia de las vacunas, la inmunidad colectiva, la relevancia de las vacunas infantiles nuevas y de larga trayectoria son importantes en el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU (Naciones Unidas 2019) y tienen una correlación con el escenario epidemiológico de sarampión en la región europea de las Américas (Hotez et al. 2020; Wilder-Smith y Qureshi 2020). Así, entre el 1 de enero de 2019 y el 27 de mayo de 2020, hubo 23,961 casos confirmados de sarampión (incluyendo 21 muertes) en 15 países y territorios de la Región Sanitaria de las Américas (Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud 2020a y 2020b). En Argentina, los datos del Ministerio de Salud mostraron que el brote de sarampión registrado desde agosto de 2019 a junio de 2020 fue el más extenso desde la eliminación de la circulación endémica, con 183 casos confirmados (uno fatal). Los casos confirmadas en todos los grupos de edad evidenciaron, asimismo, una cobertura poblacional inferior al nivel recomendado para evitar la circulación del agente (Ministerio de Salud (Argentina) 2020b).

En cuanto al carnet de vacunación, recientemente se implementó una Cartilla de Vacunación Digital Unificada (Ministerio de Salud (Argentina) 2019), por lo que el registro individual y comunitario está asegurado. Pero cabe destacar la proporción de adultos que no muestra adherencia al calendario de vacunación. Incluso cuando esto no se refleja en lo expresado sobre la población pediátrica, es una medida de la falta de conciencia sobre la protección comunitaria que brindan las vacunas.

La comparación de datos categorizados muestra una tendencia hacia una mayor duda o desconfianza sobre las vacunas en Yacanto, aunque la frecuencia de rechazo fue significativamente mayor entre jóvenes de Córdoba. Se evidenció mayor circulación de información negativa sobre vacunas en el área urbana, pero el impacto en la adherencia a las vacunas fue mayor en el área rural, donde también hubo mayor preocupación por los riesgos de las nuevas vacunas. Las diferencias en los patrones de respuesta de las comunidades urbana y rural indican la necesidad de planificar o incrementar las intervenciones de diálogo para mejorar y nivelar la llegada continua de información de calidad a la población, evidenciando a su vez el rol central de la educación en salud como generador de conciencia sobre la importancia de la atención sanitaria preventiva y la voluntad de aprovecharla (Sabates y Feinstein 2006). Algunas metas de salud pública requieren elevadas coberturas poblacionales que dependen de una adherencia global alta y homogénea (Gastañaduy et al. 2018), por lo que las desigualdades regionales desafían

el logro de tales objetivos. Como señalan otros autores, las desigualdades en la cobertura de inmunización por geografía, situación urbano-rural y socioeconómica (relacionadas a la confianza y aceptación de las vacunas, el acceso y la información sobre planes y programas disponibles) requieren estrategias renovadas de comunicación y vacunación (Mantel y Cherian 2020; Shimizu et al. 2020). En este contexto, es importante tomar en cuenta las oportunidades emergentes para construir mejores sistemas y servicios de inmunización, implementando medidas tendientes a la equidad por región y dentro de los países. Esto implica garantizar el acceso a las vacunas, mantener registros actualizados de la cobertura poblacional y monitorear el índice de confianza y aceptación de las vacunas (Larson y Schulz 2019).

En conclusión, este estudio muestra que las vacunas son ampliamente aceptadas en los grupos estudiados, pero una proporción manifiesta preocupación por su seguridad (si bien muchos reticentes aún son aceptadores de vacunas) y se observa una tendencia similar en ambos entornos, urbano y rural. A pesar de ello, la mayoría de los padres vacunan a sus hijos con las vacunas del calendario. La falta de adherencia al calendario se relacionó principalmente con la información recibida y el conocimiento de las vacunas. Por tanto, es importante reforzar continuamente la llegada de información de calidad sobre las vacunas y los programas de vacunación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, H. et al. (2012) Recomendaciones Nacionales de Vacunación Argentina 2012, Ministerio de Salud - ProNaCEI.
- Acevedo, G. et al. (2016) 'Asociación de cobertura de vacunación con factores sociodemográficos, en trabajadores de centros de salud de primer nivel de atención, Córdoba-Argentina.', Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC, 73(3), pp. 163–169.
- Área Epidemiología. Ministerio de Salud. Provincia de Córdoba (2020) Alerta Epidemiológica: Caso confirmado de Sarampión en Córdoba, SE8 2020.
- Arrossi, S. et al. (2012) 'Acceptability and uptake of HPV vaccine in Argentina before its inclusion in the immunization program: A population-based survey', Vaccine. Elsevier Ltd, 30(14), pp. 2467–2474. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.032.
- Bonvehí, P. et al. (2017) ACTA I REUNIÓN COMISIÓN NACIONAL DE INMUNIZACIONES (CoNaIn).
- CDC/GAVI/UNICEF/OMS and Banco Mundial (2010) 'Vacunas e inmunización : situación mundial'. Edited by OMS, p. 236. Available at: https://www.who.int/publications/list/immunization_sowvi/es/ (Accessed: 19 December 2019).
- Comité Regional de la OMS para las Américas (2017) 'Plan de acción para la sostenibilidad de la eliminación del sarampión, la rubéola y el síndrome de la rubéola congénita en las Américas 2018-2023.', p. 22. Available at: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34446/CSP29-8-s.pdf;jsessionid=C66223DAC10B4239FB410B75D3A7DC7B?sequence=2.

- Gentile, A. et al. (2015) 'Influenza vaccine: Delayed vaccination schedules and missed opportunities in children under 2 years old', Vaccine. Elsevier Ltd, 33(32), pp. 3913–3917. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.06.065.
- Gobierno de la Provincia de Córdoba (2018) Conocé Córdoba – Dirección General de Estadística y Censos, Dirección General de Estadística y Censos, Subdirección de Cartografía y Sistemas de Información Geográfica. Available at: https://estadistica.cba.gov.ar/conoce-cordoba/ (Accessed: 16 January 2020).
- INDEC (2012) Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010: Censo del Bicentenario. Resultados definitivos., Instituto Geográfico Nacional (IGN). Available at: http://www.sig.indec.gov.ar/censo2010/.
- Larson, H. J. et al. (2014) 'Understanding vaccine hesitancy around vaccines and vaccination from a global perspective: A systematic review of published literature, 2007-2012', Vaccine. Elsevier BV, 32(19), pp. 2150–2159. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.081.
- Larson, H. J. et al. (2015) 'Measuring vaccine hesitancy: The development of a survey tool', Vaccine, 33(34), pp. 4165–4175. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.037.
- Larson, H. J. et al. (2016) 'The State of Vaccine Confidence 2016: Global Insights Through a 67-Country Survey', EBioMedicine. The Authors, 12, pp. 295–301. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.08.042.
- Larson, H. J. and Schulz, W. S. (2019) 'Reverse global vaccine dissent', Science, 364(6436), p. 105. doi: 10.1126/science.aax6172.
- MacDonald, N. E. et al. (2015) 'Vaccine hesitancy: Definition, scope and determinants', Vaccine. Elsevier Ltd, 33(34), pp. 4161–4164. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.036.
- Mantel, C. and Cherian, T. (2020) 'New immunization strategies: adapting to global challenges', Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 63(1), pp. 25–31. doi: 10.1007/s00103-019-03066-x.
- Ministerio de Salud Argentina (2020) Sarampión : actualización de la situación en Argentina, Actualización epidemiológica.
- Ministerio de Salud de la Nación (2011) Conclusiones del II Simposio Internacional de inmunizaciones en Argentina. Available at: http://lasongylagente.blogspot.com/2011/07/conclusiones-del-simposio-internacional.html (Accessed: 14 January 2020).
- Ministerio de Salud de la Nacion Argentina (2019) Vacunas y Calendario de Vacunación. Available at: https://www.argentina.gob.ar/salud/vacunas (Accessed: 14 January 2020).
- Opel, D. J. et al. (2013) 'The Architecture of Provider-Parent Vaccine Discussions at Health Supervision Visits', Pediatrics, 132(6), pp. 1037–1046. doi: 10.1542/peds.2013-2037.
- Organización Panamericana de la Salud and World Health Organization (WHO) (2020) Actualización Epidemiológica Sarampión. Available at: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=sarampion-2183&alias=51391-24-de-enero-de-2020-sarampion-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=es.

- Organización Panamericana de Salud (2013) 'Plan de Acción Mundial sobre Vacunas 2011-2020', Organización Mundial de la Salud, p. 149. doi: Clasificación NLM: WA 115.
- Sabates, R. and Feinstein, L. (2006) 'The role of education in the uptake of preventative health care: The case of cervical screening in Britain', Social Science and Medicine, 62(12), pp. 2998–3010. doi: 10.1016/j.socscimed.2005.11.032.
- Secretaría de Gobierno de Salud, P. de la N. A. (2019) Carnet Unificado de Vacunación Digital | Argentina.gob.ar. Available at: https://www.argentina.gob.ar/noticias/carnet-unificado-de-vacunacion-digital (Accessed: 24 February 2020).
- Wakefield, A. et al. (1998) 'Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children', Lancet, 351(FEbruary 28), pp. 637–641. doi: 10.1016/S0140-6736(05)77837-5.
- WHO SAGE (2016) 'Vaccine Hesitancy Survey Questions Related to SAGE Vaccine Hesitancy Matrix', pp. 1–8.
- World Health Organization (2015a) Reticencia a la vacunación: Un desafío creciente para los programas de inmunización, Centro de Prensa. Available at: https://www.who.int/es/news-room/detail/18-08-2015-vaccine-hesitancy-a-growing-challenge-for-immunization-programmes (Accessed: 14 January 2020).
- World Health Organization (2015b) 'Summary WHO SAGE conclusions and recommendations on Vaccine Hesitancy', (January), pp. 1–5. Available at: http://www.who.int/immunization/programmes_systems/summary_of_sage_vaccinehesitancy_2pager.pdf?ua=1%0Ahttp://www.who.int/immunization/programmes_systems/summary_of_sage_vaccinehesitancy_2pager.pdf?ua=1%0Ahttp://www.who.int/immunization/programmes_systems/.
- World Health Organization (2019) Immunization coverage, Fact sheet N 378. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage (Accessed: 19 December 2019).

ABSTRACT

Social determinants of vaccine hesitancy and uptake in urban and rural environments of Córdoba, Argentina: a cross-sectional survey before the COVID-19 pandemic.

We investigated vaccine hesitancy during 2018-2019 in urban and rural settings of Córdoba, Argentina, for which a cross-sectional survey with a standardized, adapted and validated questionnaire was used. A total of 1415 participants were surveyed, 1112 residents of Córdoba city and 303 of Yacanto, a rural community. Seventeen percent had doubts or mistrust about vaccines in Córdoba and 23% in Yacanto, while 9 and 10%, respectively, rejected a vaccine, mostly due to concerns about safety / adverse effects. In Córdoba, forgetting to get a vaccine was another frequent cause for not being vaccinated and 50% expressed it is difficult for other people in the community to have access to vaccines. In Córdoba 57% received negative information about vaccines and in Yacanto, 38%; of them, 8% and 24% ($p<0.001$) changed their mind about getting a vaccine, and 19% and

26% (p=0.009), respectively, considered children do not require vaccines for diseases that are no longer common. Six and 13% adults had incomplete immunization schedules, but in only 5% their children had incomplete immunization schedule. Thus, urban and rural communities showed differences that should be monitored and delivery of quality information on vaccines should be reinforced continuously in the entire population.

Keywords: attitude; acceptance; trust; immunization schedule; vaccine-preventable diseases.

ANEXO I

Cuestionario "Percepción sobre las vacunas en Córdoba", versión 1.4

Edad: _ Géneo: M_ F_ no binario_
Estudios: primarios_ secundarios_ terciarios/universitarios_
Ocupación:
Si es estudiante universitario, ¿qué carrera cursa?
¿Tiene hijos/menores a cargo? SI_ NO_

1. ¿Cree que las vacunas pueden proteger a los niños de enfermedades graves? SI_ NO_

2. ¿Cree que los padres vacunan a sus niños con todas las vacunas recomendadas? TODOS_ MAYORÍA_ ALGUNOS_

3. ¿Alguna vez tuvo dudas/desconfianza sobre vacunarse/vacunar a sus hijos? SI_ NO_

4. ¿Alguna vez ha rechazado alguna vacuna indicada? SI_ NO_

5. Si la respuesta a las preguntas 3 o 4 fue "SI", por favor indique cuál/cuáles vacunas:
Duda o desconfianza:
Rechazo:
¿Cuál fue la razón? (puede marcar todo lo que corresponda)
No pensé que era necesario_
No sabía dónde obtener la vacuna_
No sabía dónde obtener información buena / confiable_
Escuché o leí comentarios negativos_
No creo que la vacuna es efectiva_
Pienso que la vacuna no es segura / me preocupan los efectos secundarios_
Alguien me dijo que la vacuna no es segura_
Tuve una mala experiencia con un vacunador anterior o centro de salud_
Tuve una mala experiencia o reacción con una vacuna previa_
Alguien me dijo que tuvo (o que su hijo/a tuvo) una mala reacción a la vacuna_
Miedo a las agujas_
No me fue posible salir del trabajo o de casa_
Razones religiosas_
Otras creencias / medicina tradicional_
Otros (por favor especifique):

6. ¿Hubo algún otro motivo por el que alguna vez no pudiera vacunarse/vacunar a sus hijos?
Ninguno_
Distancia al dispensario, hospital o lugar de vacunación_
Horario de atención_
Tiempo de espera en el hospital o vacunatorio_

Costos_
Me olvidé_
Otro (por favor especifique):

7. ¿Tiene alguna razón para pensar que los niños no deben ser vacunados? SI_ NO_
En caso afirmativo, por favor especifique:

8. ¿Cree que es difícil para algunas personas en su comunidad tener acceso a las vacunas?
SI_ NO_ NO SÉ_
En caso afirmativo, ¿cuál cree usted que pueden ser las razones?
A. No se sienten bienvenidos en el servicio de salud_
B. Los servicios de salud no los incluyen o alcanzan_
C. Otro (por favor especifique):

9. ¿Alguna vez recibió u oyó información negativa acerca de las vacunas? SI_ NO_
En caso afirmativo,
a. Puede dar un ejemplo:
b. Con esa información ¿cambió de opinión acerca de vacunarse/vacunar a su hijo/s? SI_ NO_
(Por ejemplo, no vacunarse con alguna vacuna indicada o no llevar a vacunarse a su hijo/s).

10. ¿Cree que los referentes en su comunidad (líder político, religioso, maestro, médico) apoyan las vacunas para bebés y niños?
NO SÉ_ SÍ_ NO_ En este caso, por favor indique:

11. ¿Está de acuerdo con las siguientes afirmaciones referidas a la vacunación?

	SI	NO	NO SÉ
Las vacunas de la niñez son importantes para la salud de los niños			
La vacunas para niños son efectivas			
Vacunarse es importante para la salud de otros en mi comunidad			
Todas las vacunas para niños que se han incluido en el calendario de vacunación de nuestro país son beneficiosas			
Las vacunas nuevas tienen más riesgos que las viejas			
Confío en la información que recibo sobre las vacunas brindada por los responsables de los programas de vacunación			
Vacunarse es una buena manera de proteger a los niños de las enfermedades			
Generalmente sigo las recomendaciones de mi doctor sobre las vacunas			
Me preocupan los efectos adversos de las vacunas			
Los niños aún necesitan vacunas para enfermedades que ya no son comunes (ej. polio, sarampión, rubéola)			

Estado de vacunación del participante
¿Tiene su carnet de inmunizaciones? SI_ NO_
¿Tiene todas las vacunas del calendario que le corresponden? SI_ NO_ NO SÉ_

Estado de vacunación de su hijo/s o menores a cargo (si tiene)
¿Tienen carnet de inmunizaciones? SI_ NO_
¿Tienen todas las vacunas que le corresponden para la edad? SI_ NO_ NO SÉ_

Si falta alguna, puede indicar cuál/cuáles y el motivo:
Participante
Hijos/menores a cargo

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO *SABETHES* (CULICIDAE), VECTORES DE FIEBRE AMARILLA SELVÁTICA, COLECTADOS EN LAS PROVINCIAS DE MISIONES Y CORRIENTES

Carla Noel Alvarez, Ana Carolina Alonso y Marina Stein

Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste
CONICET CCT Nordeste

INTRODUCCIÓN

La Fiebre Amarilla (FA) es una de las enfermedades reemergentes más importantes que afecta a las poblaciones humanas, con una tasa de mortalidad elevada que puede alcanzar el 50% o 60% (Strano *et al*., 1975). La FA en América presenta dos ciclos de trasmisión, un ciclo selvático y un ciclo urbano. La FA selvática (FAS) es una enfermedad ocupacional y su erradicación es casi imposible, manteniéndose activa en zonas tropicales de África y América del Sur donde la infección se trasmite al ser humano por la picadura de hembras de mosquitos de los géneros *Sabethes* Robineau- Desvoidy y *Haemagogus* Williston infectadas a través de la picadura previa a monos virémicos (MSN, 2010); mientras que, el ciclo urbano se da entre personas virémicas y personas susceptibles, a través del vector *Aedes aegypti* Linnaeus que posee hábitos domésticos (MSN, 2010). La medida más importante para la prevención de la FA es la vacunación, sin embargo la inmunización sistemática en la infancia o a través de campañas masivas no es suficiente para alcanzar a inmunizar al 100% de la población, principalmente en zonas rurales. Durante el 2008-2009 se detectó en Argentina la reemergencia de la FAS con la confirmación de 9 casos humanos en la provincia de Misiones; siendo en los meses previos confirmada la ocurrencia de epizootias en *Alouatta caraya* Humboldt (mono aullador) en diversas localidades de dicha provincia; previamente a esta situación en el país no se registraban casos de FAS desde 1967 y no se reporta FA urbana desde 1905 (MSN, 2017). En los últimos años la FA se ha intensificado, y ha pasado de una actividad restringida a zonas selváticas a presentar brotes urbanos (Espinal *et al*., 2019). De acuerdo al Ministerio de Salud de la Nación son seis provincias cuyos departamentos presentan ambientes eco-epidemiológicos favorables para la transmisión de FAS (Misiones, Corrientes, Formosa, Chaco, Salta y Jujuy).

El género *Sabethes* posee una distribución geográfica restringida al neotrópico. Se encuentra estrechamente asociado a ambientes boscosos y selváticos, aunque en algunas ocasiones puede encontrarse cercano a los ambientes urbanos (Harbach, 2008), principalmente en aquellas ciudades dónde la urbanización se encuentra contigua a la selva como es el caso de diferentes municipios de la provincia de Misiones. Los estados inmaduros son habitantes exclusivos de fitotelmata, es decir, cavidades vegetales que

acumulan agua como axilas de hojas de bromelias, internudo de bambú, hueco de árboles, etc. Para Argentina están citadas 12 especies de este género distribuidas en 7 provincias, 6 de las cuales implican áreas de potencial riesgo de brotes de FA: Misiones (12), Chaco (2), Formosa (1), Corrientes (2), Salta (4), Santa Fe (1) y Tucumán (1) (MSN, 2017).

La capacidad vectorial de los mosquitos hace que la correcta identificación de sus especies sea fundamental. Una de las herramientas esenciales para este fin son las claves dicotómicas (Darsie 1985; Lane 1953), que se basan en la observación de caracteres morfológicos. Sin embargo esta tarea suele ser dificultosa debido a la existencia de complejos de especies, híbridos y especies cripticas, sumado a la necesidad de que los ejemplares se encuentren en excelente estado de conservación. En la actualidad el uso de herramientas moleculares es una alternativa y/o complemento a la identificación morfológica. DNA Barcode es un método estándar de identificación de especies propuesto por Hebert *et al*. (2003), está constituido por un fragmento de 648 pares de bases (pb) en dirección 5`del gen Citocromo Oxidasa I (COI) que forma parte del complejo IV de la mitocondria. En el año 2008 se establece el Proyecto Internacional de Código de Barras de la Vida (iBOL por sus siglas en inglés) como una alianza que involucra a distintas naciones, con Argentina como parte del grupo de 26 países que la integran. El iBOL es un proyecto mundial que busca, a partir del financiamiento de distintos programas, transformar la ciencia de la biodiversidad mediante la construcción de bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN, instalaciones de secuenciación, plataformas informáticas, protocolos analíticos y la colaboración internacional necesaria para inventariar y evaluar la biodiversidad (iBOL, 2022).

Por lo anteriormente expuesto el empleo de éstas técnicas moleculares para asistir a la taxonomía clásica de culícidos es de importancia en la determinación y confirmación de especies implicadas en la transmisión de arbovirosis, además de la significativa contribución al conocimiento de la biodiversidad de mosquitos.

OBJETIVOS

1- Detectar infección natural del virus de Fiebre Amarilla en mosquitos del género *Sabethes*.

2- Utilizar la técnica DNA Barcode para la identificación y confirmación taxonómica de especies del género *Sabethes* que se encuentran presentes en una zona de riesgo de FAS.

3- Contribuir al conocimiento en biología molecular de un género de importancia médica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material procesado proviene de la localidad de San Cayetano, provincia de Corrientes y la localidad Eldorado, provincia de Misiones. Se realizó la identificación taxonómica de los estados inmaduros y adultos de la respectiva cría mediante las claves dicotómicas de Lane 1953, Darsie 1985 y Harbach 1994, y las descripciones originales de Coquillett 1906. Resultado de ello se identificaron 4 especies del género *Sabethes* A los ejemplares adultos de las especies y morfoespecie, previamente identificadas morfológicamente, se les extrajo una pata, que no tuviera importancia taxonómica, que se la conservó en alcohol 96% para la preservación del material genético. Dichas muestras rotuladas fueron

enviadas al Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (ciudad de Buenos Aires) para la extracción y secuenciación del ADN. Posteriormente estas secuencias de códigos de barras serán colocadas en la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD), un banco de trabajo en línea que incluye una biblioteca de referencia de códigos de barras de ADN y permitiría asignar identidades a secuencias de origen desconocido; para lo que se generó el proyecto CUNAR -Culicidae of northeastern Argentina- que cuenta con un repositorio fotográfico de los ejemplares seleccionados junto a los datos de colecta correspondiente a cada espécimen (fecha y lugar de colecta, datos georeferenciados, datos del colector, etc.) en la plataforma BOLD.

El resto del material fue conservado en alcohol y se procesó en el Instituto de Medicina Regional dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste. Para la extracción de ADN genómico de larvas de estadio IV de las especie*s* identificadas se utilizó un kit comercial (Wizard (R) Genomic DNA Purification PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La visualización del ADN fue mediante geles de agarosa al 1% suplementados con Gel Red (GenBiotech), bajo luz UV con un transiluminador (uvipro Bronze). La amplificación del ADN para la identificación de las especies se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificó un segmento de 658 pb de la sub unidad I de la citocromo c oxidasa (COI) utilizando los cebadores S1718 y A2442 (Normark, 1996), Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las descriptas por Rodriguero *et al*., (2010). Los productos de la PCR se visualizaron utilizando geles de agarosa al 2% suplementados con Gel Red (GenBiotech), bajo luz UV con un transiluminador (uvipro Bronze). Los fragmentos genómicos serán enviados para su secuenciación a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Para la detección de infección natural del virus de Fiebre Amarilla se empleó la técnica de RT-PCR con primers genéricos para amplificar y detectar ARN viral de Flavivirus recuperados de mosquitos. Los *pooles* positivos fueron procesados por RT Nested-PCRs específica para FA.

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar un fragmento de la sub unidad I de la citocromo c oxidasa (COI).

Nombre del cebador	Secuencia
S1718	5’ GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC3’
A2442	5’ CCAACAGGAATTAAAATTTTTAGATGATTAGC 3’

RESULTADOS

Se identificaron un total de 30 especímenes, 15 adultos y 15 larvas, correspondientes a tres especies; *Sabethes identicus* (9), *Sa. glaucodaemon* (8), *Sa. undosus* (6) y una morfoespecie denominada *Sabethes* sp.(7) (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancia de las especies de mosquitos del género *Sabethes* identificados de las localidades de San Cayetano (Corrientes) y Eldorado (Misiones).

	Larvas (estadío IV)	Machos	Hembras
San Cayetano			
Sabethes identicus	7	0	2
Sabethes glaucodaemon	0	0	0
Sabethes undosus	2	0	0
Sabethes sp.		1	0
Eldorado			
Sabethes identicus	0	0	0
Sabethes glaucodaemon	1	3	4
Sabethes undosus	0	2	2
Sabethes sp.	5	0	1
Total	15	6	9

El material enviado al museo Argentino de Ciencias Naturales correspondió a las patas de los 15 ejemplares adultos, 6 machos y 9 hembras. A causa de la pandemia de COVID-19 el envío de dichas muestras y el posterior procesamiento se ha retrasado. En la figura 1 se presenta la imagen de sitio web IBOL con el proyecto CUNAR – Culicidae of northeastern Argentina- subido a la plataforma.

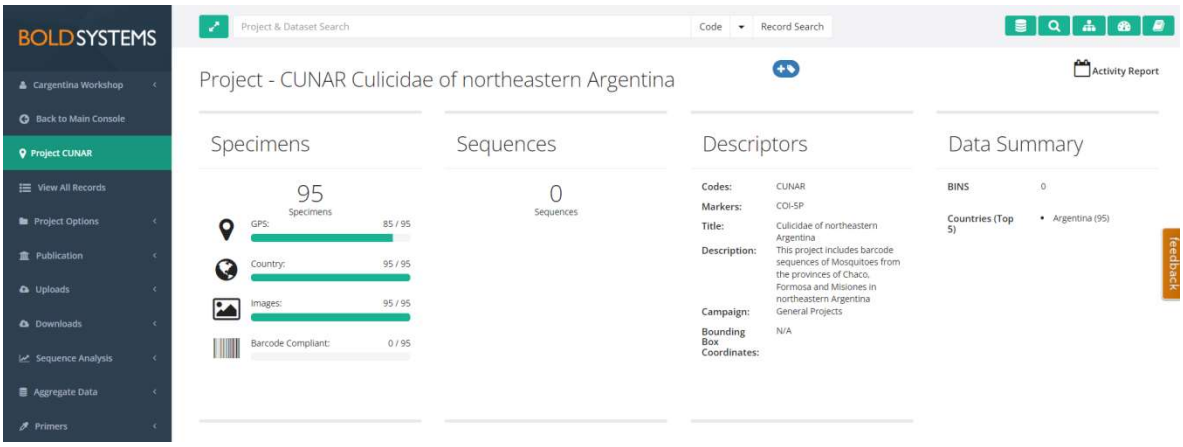


Figura 1. Imagen de la plataforma Barcode of Life Data Systems (BOLD) database, con información del proyecto CUNAR – Culicidae of northeastern Argentina -.

Con respecto al material procesado en nuestro instituto se realizó la extracción de ADN genómico de seis larvas; cuatro colectadas en la localidad de San Cayetano (Corrientes), dos pertenecientes a la especie *Sa. undosus* (identificados como: VII-1 Coi 1 y III-1 Coi 2) y dos a la especie *Sa. identicus* (identificados como: Tc V-1 Coi 3 y Tc V-1 Coi 4); y dos larvas colectadas de la localidad de Eldorado (Misiones), una correspondiente a la especie *Sa. glaucodaemon* (PT-M9) y otro *Sa.* sp. (M12-Sa-(sin)) que no pudo identificarse a nivel de especie por medio de sus características morfológicas. En la figura 2 se observa el ADN genómico total extraído.



Figura 2. Gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red. Carril 1: ADN genómico total de *Sabethes undosus* (VII-1 Coi 1). Carril 2: ADN genómico total de *Sa. undosus* (III-1 Coi 2). Carril 3: ADN genómico total de *Sa. identicus* (Tc V-1 Coi 4). Carril 4: ADN genómico total de *Sa. identicus* (Tc V-1 Coi 3). Carril 5: ADN genómico total de *Sa. glaucodaemon* (PT-M9). Carril 6: ADN genómico total de *Sabethes sp*. (M12-Sa-(sin)).

Se amplificó un segmento de aprox. 600 pb de la sub unidad I de la citocromo c oxidasa (COI) utilizando los cebadores S1718 y A2442 (Tabla 2), encontrándose dificultades en la amplificación del fragmento esperado por lo que se procedió a una optimización de las condiciones de la PCR para su posterior envío al servicio de secuenciación.

Se realizaron diluciones (1/10) del material genético previo a la amplificación, ya que probablemente la cantidad de ADN podría interferir en la reacción. Se preparó nuevamente la reacción de amplificación utilizando como templado 5 µl de la dilución de ADN, el resto de los componentes no se modificaron y las condiciones de amplificación fueron las descriptas previamente. Se logró amplificar las muestras *Sa. undosus* (III-1 Coi 2), *Sa. identicus* (Tc V-1 Coi 4) y *Sabethes* sp. (M12-Sa-(sin)) (Figura 2).

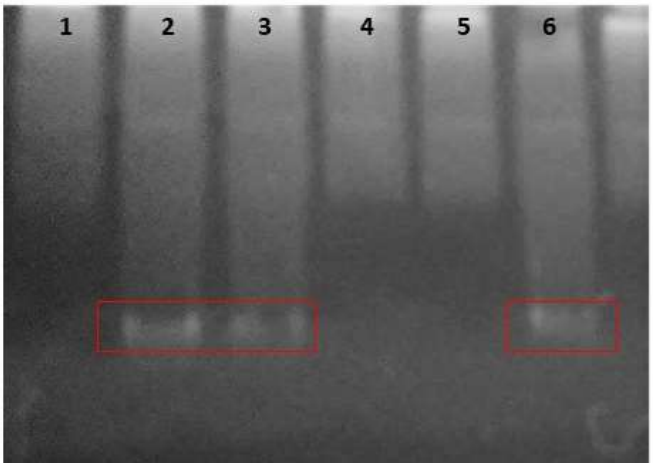


Figura 2. Gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red. Carril 1: ADN *Sabethes undosus* (VII-1 Coi 1). Carril 2: ADN *Sa. undosus* (III-1 Coi 2). Carril 3: ADN *Sa. identicus* (Tc V-1 Coi 4). Carril 4: ADN *Sa. identicus* (Tc V-1 Coi 3). Carril 5: ADN *Sa. glaucodaemon* (PT-M9). Carril 6: ADN Sabethes sp. (M12-Sa-(sin)). Rectángulo rojo: se remarcan las muestras que se consiguieron amplificar.

Debido a que en algunas muestras no se amplificó el fragmento de interés se realizó nuevamente la extracción de ADN de las siguientes muestras de larvas de estadio IV de las especies *Sabethes identicus* y *Sabethes* sp.

Muestras:

1- *Sabethes identicus* (Identificado como: XVII-14 Tubo 12 A)

2- Sabethes identicus (Identificado como: XVII-19 Tubo 12 B)

3- *Sabethes identicus* (Identificado como: X-7 Tubo 13 A)

4- *Sabethes identicus* (Identificado como: X-9 Tubo 13 B)

5- *Sabethes identicus* (Identificado como: X-11 Tubo 13 C)

6- *Sabethes* sp. (Identificado como: M14 Tubo 10)

7- *Sabethes* sp. (Identificado como: M16 Tubo 11)

8-Sabethes sp. (Identificado como: M2 Tubo 14)

9- Sabethes sp. (Identificado como: M7 Tubo 15)

Se realizaron nuevamente las reacciones de amplificación logrando obtener el fragmento de interés de las muestras 6, 7, 8 y 9. Las muestras que se encuentran pendientes de enviar corresponden a: *Sabethes undosus* (San Cayetano, Corrientes), *Sabethes identicus* (San Cayetano, Corrientes), cinco individuos de *Sabethes* sp. (Eldorado, Misiones).

En cuanto a la detección del virus de Fiebre Amarilla en mosquitos *Sabethes* la PCR genérica arrojó resultados negativos.

CONCLUSIÓN

Distintas dificultades se han presentado a lo largo del período de trabajo en la presente investigación destacando entre ellos: el aumento del dólar y luego el impuesto PAIS (establecido por ley del Congreso Nacional en el marco de una emergencia económica) donde los servicios que operan en moneda extranjera (dólar) tienen un 30% de "recargo", incrementando así los costos de insumos y servicios de secuenciación; y el contexto de emergencia sanitaria por la pandemia por el nuevo brote de Coronavirus - COVID 19 durante 2020, con el Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (Decreto 297/2020) establecido por el gobierno nacional. Estos inconvenientes sumados al bajo número de ejemplares del género *Sabethes* recuperados de campañas anteriores han imposibilitado cumplir la totalidad de los objetivos propuestos.

No obstante, el hecho de haber complementado esta investigación con el proyecto *Barcode of life* trabajando en conjunto con el Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia habilita la posibilidad de, una vez realizada la extracción, amplificación y secuenciación de las muestras enviadas, disponer de las secuencias resultantes para comparar con las bases de datos de referencia para encontrar las especies coincidentes. Esta información, con más datos de los especímenes procesados (lugar y fecha de colecta, imágenes, información del colector, etc.) estará disponible en http://v4.boldsystems.org/.

Por otro lado, las muestras amplificadas en nuestro laboratorio se encuentran a la espera de ser enviadas a secuenciar a Macrogen (Korea), debido a que los costos nos obligan a juntar un cierto número de muestras antes del su envío.

BIBLIOGRAFÍA

- Coquillett DW. 1906. New Culicidae from the West Indies and Central America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 7: 182-186.
- Darsie RF.1985. Mosquitoes of Argentina. Part I. Keys for identification of adult females and fourth stages larvae in English and Spanish (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 17: 153-253.
- Espinal MA, Andrus JK, Jauregui B, Hull Waterman S, Morens DM, Santos JI, Horstick OF, Lorraine A, Olson D. 2019. Emerging and reemerging *Aedes*-transmitted arbovirus infections in the Region of the Americas: implications for health policy. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43: 1-8.
- Harbach RE. 2008. Mosquito Taxonomic Inventory: Culicidae classification. http://mosquito-taxonomic-inventory.info/ (accedido 30 de julio de 2020).
- Harbach RE. 1994. The subgenus *Sabethinus* of *Sabethes* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 19:207-234.
- iBOL. International Barcode of Life.2022. Disponible en: https://ibol.org/.
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: S96–S99. Doi:10.1098/rsbl.2003.0025.
- Lane J. 1953. *Neotropical Culicidae*. 1st/2nd ed. Editora da Universidade de Sao Paulo, Indústria Grafica Siqueira SA, São Paulo, 1112 pp.

- MSN. Ministerio de Salud de la Nación. 2010. Enfermedades infecciosas. Fiebre Amarilla. Diagnóstico de Fiebre Amarilla. Guía para el equipo de salud Nro. 1. 2da. Edición, Buenos Aires, 32 pp.
- MSN. Ministerio de Salud de la Nación. 2017. Alerta Epidemiológica. Nº1, Semana epidemiológica 3.
- Normark BB. 1996. Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 50(2): 734-745.
- Rodriguero MS, Confalonieri VA, Guedes JVC & Lanteri AA. 2010. *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): association between thelytokous parthenogenesis and infection status. *Insect Molecular Biology*, 19(5): 631–640.
- Strano AJ, Dooley JR, Ishak KG. Manual sobre la Fiebre Amarilla y su diagnóstico diferencial histopatológico. Washington, USA: OPS; 1975. Publicación científica: 299.

ABSTRACT

Yellow Fever (YF) is one of the re-emerging diseases that most affect human populations, with cycles of sylvatic (SYF) and urban transmission in America. Female mosquitoes of the genus *Sabethes* Robineau-Desvoidy are vectors of SYF. The vectorial capacity of these insects makes the correct identification of their species essential. Molecular techniques are tools of importance to assist classical taxonomy in determining and confirming the Culicidae species involved in arbovirus transmission. The objectives of this research were to detect natural infection of the YF virus in mosquitoes of the *Sabethes* genus; to use the DNA Barcode technique for the identification and taxonomic confirmation of *Sabethes* species present in an area at risk of SYF, and to contribute to the knowledge of molecular biology of a genus of medical importance. Dichotomous keys and original descriptions were use for taxonomic identification based on morphological characters of immature and adult stages of specimens from Corrientes and Misiones. Thirty mosquito specimens identified, 15 adults and 15 larvae, correspond to *Sabethes identicus* (9), *Sa. glaucodaemon* (8), *Sa. undosus* (6) and *Sabethes* sp (7). The samples pending shipment for sequencing correspond to *Sabethes undosus* (Corrientes), *Sabethes identicus* (Corrientes), and five individuals of *Sabethes* sp. (Missions). Regarding the detection of the SYF virus, the generic PCR yielded negative results for the detection of flavivirus. Several difficulties have made it impossible to satisfy all of the presented objectives. However, this research was complementing by the project of Barcode of Life collaborating with the Bernardino Rivadavia Argentine Museum of Natural Sciences, which enable the possibility of having the resulting sequences and comparing them with the reference databases available in IBOLD to find the species matches.

RELACIÓN ENTRE LEPTINA MATERNA Y GANANCIA DE PESO INFANTIL EN LOS PRIMEROS SEIS MESES DE LACTANCIA. IMPORTANCIA DE LA OBESIDAD MATERNA. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN CÉLULAS SANGUÍNEAS

María Florencia Andreoli

Instituto de Desarrollo e Investigaciones Pediátricas (IDIP) "Prof. Dr. Fernando Viteri", HIAEP Sor María Ludovica de la Plata - Ministerio de Salud / Comisión de Investigaciones Científicas CIC-PBA

INTRODUCCIÓN

Este proyecto estudia el rol que juegan el sobrepeso u obesidad y el ambiente hormonal de la madre sobre el crecimiento del niño, y busca marcadores en sangre de valor clínico para objetivar la sensibilidad a hormonas. Inicialmente se diseñó para estudiar el rol de la leptina, extendiéndose luego a la insulina y el cortisol.

La etiología del sobrepeso y la obesidad es multifactorial, y reside en un estilo de vida sedentario, además de una dieta hipercalórica [1] y otros factores que aumentan la susceptibilidad al almacenamiento de grasa en presencia de un entorno obesogénico, como factores genéticos, estado nutricional de la madre durante el embarazo y alimentación durante el primer año de vida [2]. Ross y Desai [3] sugirieron que la obesidad en la niñez y la edad adulta puede ser una consecuencia de la programación de la hiperfagia derivada de las anormalidades nutricionales de la madre durante el embarazo y la lactancia, como la malnutrición y la obesidad materna. Ambas afecciones aumentan el riesgo de hiperfagia y obesidad en la descendencia [3].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la **leche materna** es la alimentación más recomendada para el recién nacido ya que confiere muchos beneficios [4]. Diversas fuentes bibliográficas han relacionado la ingesta de leche materna con un efecto protector contra la obesidad y otras enfermedades metabólicas [5, 6]. Existe evidencia que demuestra que, además de ser una fuente nutricional, la leche materna ejerce control sobre el metabolismo del recién nacido mediante la transferencia de compuestos bioactivos como las hormonas metabólicas, que pueden regular la composición corporal al controlar la programación de ingesta de alimentos, lo que influye en el equilibrio energético en las etapas posteriores de la vida. Estos compuestos no se encuentran en las fórmulas infantiles [5, 6]. Las hormonas metabólicas secretadas en la leche materna pueden regular las actividades de varios tejidos y órganos hasta que el sistema endocrino del recién nacido comience a funcionar. Estas hormonas incluyen entre otras la leptina, insulina y cortisol [5]. Es biológicamente plausible que estas hormonas pasen desde la leche materna a la circulación del niño sin perder su estructura ni su actividad biológica debido a diversos mecanismos [7, 8]. Primero, la leche materna, especialmente el calostro y la leche temprana, tiene altas concentraciones de α1-antitripsina, un conocido inhibidor de proteasas [9, 10]. En segundo lugar, el tracto gastrointestinal del lactante favorece la absorción de compuestos bioactivos y proteínas en la leche materna debido al alto pH del

intestino [10, 11]. En tercer lugar, la inmadurez de la actividad enzimática pancreática favorece la absorción de factores bioactivos al resistir la proteólisis [10]. En cuarto lugar, el tracto gastrointestinal posee receptores para compuestos bioactivos específicos [5, 12]. En quinto lugar, una importante vía no digestiva para la absorción de péptidos y compuestos bioactivos es la difusión pasiva, que desempeña un papel importante en la infancia [8]. Se cree que estos factores demuestran colectivamente la verosimilitud biológica y fisiológica de que los compuestos bioactivos no nutritivos pueden entrar en la circulación del niño y producir resultados significativos en su salud.

La **insulina** es una hormona que juega un papel central en el metabolismo de la glucosa, y también regula la ingesta de alimentos dada su acción anorexígena a nivel central [13]. La presencia de insulina en leche humana fue descrita hace más de dos décadas [14], pero su función en el recién nacido no ha sido totalmente establecida. Diversos autores describen que la insulina secretada en la leche puede tener un papel importante para el niño y posiblemente esté involucrada en su desarrollo [15, 16]. Durante el embarazo, los cambios fisiológicos incluyen aumento de la glucosa en sangre e hiperinsulinemia, parámetros que disminuyen rápidamente durante los primeros 5 días postparto en madres sanas [15, 16]. Sin embargo, en las madres con diabetes, sobrepeso u obesidad estos valores no se normalizan [14, 15]. La insulina en la leche materna se secreta en concentraciones similares a los niveles circulantes de la madre sana [17], sin embargo, no es clara la diferencia de estos valores entre madres obesas y normopesas. Un estudio ha reportado que la concentración de insulina en la leche de mujeres obesas es ~ 7 veces mayor que la concentración de insulina en la leche de mujeres normopesas a las 6 semanas postparto [15, 17], mientras que otros autores informaron que el índice de masa corporal (IMC) materno no se correlaciona con la concentración de insulina en la leche [18]. Los efectos de la insulina en leche materna sobre el crecimiento del niño tampoco han sido completamente esclarecidos: ciertos estudios afirman que mayores niveles de esta hormona se asocian con un menor peso y masa magra del niño[16], indicando que la concentración de insulina en la leche afecta la composición corporal y el crecimiento del niño. Por otro lado, otros estudios han reportado que no existe asociación entre estos parámetros [18]. Por ello, es importante estudiar si la insulina secretada en la leche materna puede tener un papel importante en el crecimiento del recién nacido durante los primeros meses de vida.

La leche humana contiene también **cortisol,** el cual es transferido desde el plasma materno [19]. Los glucocorticoides de la leche ingerida por el niño atraviesan fácilmente la barrera epitelial intestinal hacia el plasma y el cerebro [20]. Además se ha reportado su síntesis en el tejido adiposo mediante la reducción de cortisona por la enzima 11 beta hidroxi-esteroide deshidrogenasa-1 (11β-HSD1) [21], lo cual podría vincular la obesidad materna con una mayor disponibilidad de cortisol en leche. Escasos estudios han reportado una relación entre el cortisol en leche materna y el peso infantil. Por un lado se ha sugerido que la exposición temprana al cortisol puede proporcionar protección contra la obesidad, ya que mayores concentraciones de esta hormona en leche materna se relacionan con menor IMC en niños de dos años de edad [22]. Sin embargo, estos estudios son controversiales ya que otros autores afirman que concentraciones más altas de cortisol en la leche se asocian con mayor aumento de peso infantil [23].

La **leptina** circula en plasma a una concentración proporcional a la cantidad de grasa corporal [24] y cruza la barrera hematoencefálica, sirviendo como señal indicativa de las reservas de energía. Se produce principalmente por el tejido adiposo, pero también por la placenta y el epitelio mamario, por lo que está presente en leche materna, habiendo correlación positiva entre la leptina en la leche y en plasma y adiposidad y sobrepeso

maternos [24-27]. Sin embargo, la influencia de la leptina de la leche materna sobre el desarrollo del lactante es poco conocida. Se sabe que esta hormona proporciona una protección moderada frente al sobrepeso, ya que mayores niveles de leptina en leche materna se asocian con un menor peso para la talla del niño [28-31]. No obstante, estos estudios fueron desarrollados en madres normopesas, desconociéndose si la obesidad de la madre condiciona la cantidad de leptina suministrada a través de la leche materna y si esto afecta el crecimiento, adiposidad y peso corporal del niño.

Se ha sugerido que el fenotipo de los hijos de madres con obesidad puede caracterizarse por una mayor tasa de crecimiento, adiposidad y glucosa sérica, desregulación del apetito, acompañados de resistencia a la insulina, resistencia a la leptina e hiperfagia, lo que aumentaría el riesgo de obesidad [32]. En estos casos el feto y el recién nacido están expuestos a un **ambiente materno obesógeno** durante la gestación o la lactancia, lo que lleva a la programación de alteraciones en genes clave implicados en la saciedad. Estudios en animales [33] muestran que la obesidad materna inducida por una dieta rica en grasas antes y durante el embarazo altera la señalización de la leptina y la insulina y la expresión de péptidos orexígenos y anorexígenos en el cerebro de la rata. Sin embargo, no existe suficiente información en humanos sobre cómo se integran las señales de los componentes en la leche que seguramente interactúan de maneras complejas para regular la ingesta de alimentos en el niño. El hecho de que el peso materno sea un determinante del contenido de hormonas en leche materna [15, 17, 22, 34, 35] sugiere que estas hormonas serían un componente que diferencia la leche de las mujeres obesas de la leche de las mujeres normopesas [36]. Aunque esta observación complica la investigación de los efectos del ambiente hormonal materno sobre el crecimiento y la adiposidad del niño, ya que los parámetros antropométricos del niño también se predicen por el peso y composición corporal maternos [37], se destaca la necesidad de comprender el papel de los compuestos bioactivos específicos en la leche materna y sus efectos sobre la adiposidad a través del diseño de estudios innovadores.

Con el descubrimiento de la leptina en los años 90 se pensó que se encontraba un freno a la epidemia de obesidad. Sin embargo, pronto se descubrió que el efecto anorexígeno de esta hormona sólo se daba en individuos con deficiencia genética en la producción de esta hormona. En las personas con obesidad común los altos niveles circulantes de leptina asociados a una gran masa grasa no pueden reducir la progresión de la obesidad, y estos individuos presentan resistencia a esta hormona [38]. La resistencia a la leptina se ha transformado en un sello distintivo de la obesidad, sobre todo porque se instaura en estadios muy tempranos, aun antes de que se observe un marcado aumento de peso en el individuo [39]. Una de las maneras de estimar la resistencia a la leptina a nivel molecular consiste en medir la expresión génica de moléculas que median la función de dicha hormona. La leptina regula la ingesta de alimentos a través de **factores clave** como la forma larga del receptor de leptina (**LEPR**) y el supresor de señalización de citoquinas 3 (**SOCS3**), expresados en neuronas hipotalámicas [40-44]. Sin embargo, los sistemas mediante los cuales la leptina regula la ingesta a nivel central son difíciles de analizar en humanos, ya que el cerebro es inaccesible para el análisis molecular. Por lo tanto, es relevante examinar si las respuestas cerebrales se reflejan en otros tejidos que son más fácilmente accesibles y susceptibles de análisis moleculares, como las células sanguíneas. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se pueden obtener fácilmente a partir de muestras de sangre, y varios estudios han reportado que estas células reflejan cambios en la expresión génica en respuesta a nutrientes específicos como los ácidos grasos y reflejan el efecto metabólico de diversas dietas relacionados con la obesidad [45-47], generando el concepto de **biomarcadores nutrigenómicos** [48-50]. Un trabajo

reciente realizado en ratas de diferentes edades [51] ha validado la expresión génica de moléculas relacionadas a la señalización de leptina, encontrando una fuerte correlación positiva para LEPR y SOCS3 entre las CMSP y el hipotálamo, y un estudio en humanos reportó una reducción de la expresión de LEPR en CMSP en pacientes con obesidad. Estos hallazgos indican que la expresión de LEPR y SOCS3 podría ser un parámetro de alto valor clínico para objetivar la sensibilidad a leptina de los pacientes con obesidad [52]. Otros genes también podrían ser considerados potenciales biomarcadores nutrigenómicos. Es conocido que el receptor de insulina (**InsR**) es fundamental en la transmisión de los efectos decisivos de la insulina sobre el metabolismo y la homeostasis energética, y su disfunción está implicada en la resistencia celular a la insulina. Estudios recientes han mostrado que los niveles de expresión de InsR en CMSP se encuentran alterados en niños con obesidad [53], y que dicha expresión es regulada por la lactancia materna [54]; sin embargo, no se ha estudiado si esto presenta correlato con el metabolismo de la glucosa de la madre. Por todo esto es de suma relevancia el estudio de biomarcadores nutrigenómicos en células sanguíneas de nuestra población, particularmente para estudiar su valor en la población materno- infantil, como posible marcador prospectivo vinculado a la obesidad

OBJETIVOS GENERALES

El presente estudio tiene como objetivo investigar en madres con peso normal (NP) y con sobrepeso u obesidad (SP/OB) pregestacional, las concentraciones de leptina, insulina y cortisol en plasma y leche materna y su relación con el crecimiento y adiposidad del niño. También pretendemos explorar la utilidad de biomarcadores nutrigenómicos en sangre periférica para objetivar la sensibilidad a leptina e insulina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Proponemos trabajar con una población de madres con NP pregestacional y con SP/OB, y que alimenten a sus hijos con lactancia materna exclusiva en el postparto temprano (10 días). Nuestros objetivos específicos son:

1) Analizar la relación entre la concentración de hormonas (leptina, insulina y cortisol) en plasma y en leche materna
2) Analizar la relación de la concentración de hormonas en plasma y leche materna con parámetros antropométricos maternos.
3) Evaluar la asociación entre la expresión génica del receptor LEPR y del supresor SOCS3 y los niveles circulantes de leptina, para conocer si las CMSP reflejan la señalización de leptina y pueden utilizarse como biomarcadores nutrigenómicos de la sensibilidad a esta hormona asociados a la obesidad.
4) Evaluar la asociación entre la expresión génica del receptor InsR y los niveles circulantes de insulina, para conocer si las CMSP reflejan la señalización de insulina y pueden utilizarse como biomarcadores nutrigenómicos de la sensibilidad a esta hormona asociados a la obesidad.

5) Evaluar si las concentraciones maternas de hormonas y los niveles de expresión de receptores y SOCS3 en el postparto temprano se asocian con el peso y la adiposidad del niño tanto en el postparto temprano como a los seis meses de edad.

Para cumplir estos objetivos proponemos (Fig.1):

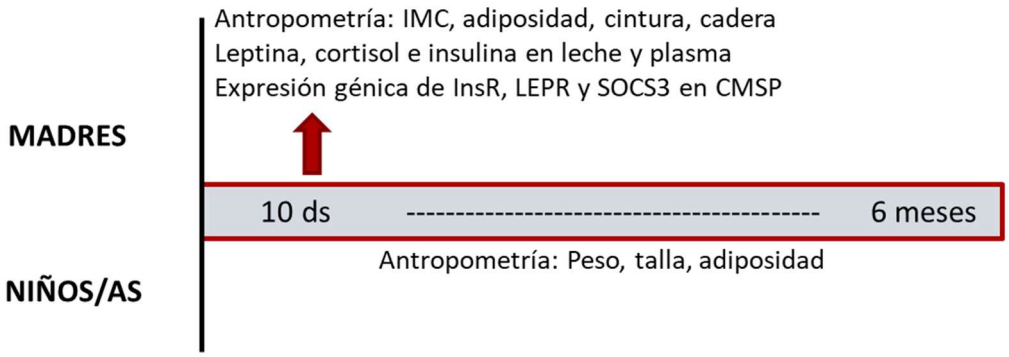
En las madres determinar:

- Parámetros antropométricos: el peso, la talla, el IMC, circunferencia de cintura, composición corporal y pliegues cutáneos (adiposidad subcutánea) a los 10 días postparto.
- Ambiente hormonal materno, representado por:
    - Niveles de insulina, leptina y cortisol en leche a los 10 días postparto.
    - Niveles de insulina, leptina y cortisol en plasma a los 10 días postparto.
- Expresión génica de moléculas relacionadas a la señalización de leptina (LEPR y SOCS3) e insulina (InsR) en CMSP a los 10 días postparto.

En los niños:

- Todos los meses hasta los 6 meses de vida: parámetros antropométricos de crecimiento: peso, talla y pliegues cutáneos (adiposidad subcutánea).

Figura 1: esquema experimental



TIPO DE DISEÑO DE INVESTIGACION Y MÉTODOS

1. Tipo de diseño de la investigación.

Estudio de cohorte.

2. Población.

2.1 Población objetivo (criterios de elegibilidad).

Madres e hijos que realizan sus controles de salud en el Sistema Público de Salud desde el nacimiento hasta los seis meses postparto.

2.2 Población de estudio.

Madres e hijos que realizan mensualmente sus controles de salud desde el nacimiento en los Consultorios del Observatorio de Salud del IDIP, HIAEP Sor María Ludovica de La Plata.

2.3 Criterios de inclusión y exclusión.

Madres: se incluyeron aquellas que realizan sus controles de salud en el Consultorio Materno del Observatorio de Salud del IDIP, con embarazo único, sin enfermedades crónicas ni agudas, diabetes gestacional, eclampsia o hipertensión en el embarazo y que aceptaron participar del estudio. Quedaron excluidas del estudio aquellas madres con bajo peso pregestacional.

Lactantes: se incluyeron lactantes clínicamente sanos, con lactancia materna (sin incorporación de fórmula infantil) y peso de nacimiento ≥ 2500 gr., de término (>37 semanas de gestación), con antecedentes feto-neonatales normales. Se excluyeron los lactantes con infecciones agudas (dentro de los 15 días previos a la incorporación al estudio), o enfermedades crónicas.

2.4 Selección y tamaño de la muestra.

Se invitó a participar a todas las diadas madre-hijo que reunieron los criterios de inclusión y que aceptaron participar del estudio. El tamaño muestral fue calculado con una potencia del 80% y una confianza del 95%, para detectar una diferencia media de 5 pg/ml en los valores medios de leptina entre mujeres con normopeso (NP) y con sobrepeso/obesidad (SP/OB). El tamaño de la muestra mínimo es de 44 díadas (22 correspondientes a madres con NP pregestacional y 22 con SP/OB), suponiendo una desviación estándar de 6,6 [55]. Ajustando por una posible pérdida en el seguimiento del 20%, sería necesario incorporar 53 diadas.

3. Metodología.

3.1 Obtención de datos y muestras.

A los 10 ds postparto las madres fueron citadas, con la indicación previa de asistir con 8 horas de ayuno. Las muestras se tomaron a primera hora de la mañana para estandarizar las condiciones en este proceso, tanto para las muestras de leche como para las de sangre. Los datos generales de la madre fueron recabados por los profesionales del Consultorio Materno del Observatorio de Salud y asentados en la Historia Clínica. La variable peso materno pregestacional fue obtenida de la libreta sanitaria de la madre. Se realizó una evaluación antropométrica y se obtuvo una muestra de leche materna (con una bomba de extracción marca Medela) para la valoración de leptina, cortisol e insulina y una muestra de sangre por punción venosa para la valoración de estas hormonas y obtención de CMSP. Los resultados publicados previamente no han mostrado diferencias significativas entre los niveles de hormonas medidos en muestras de leche materna obtenidas en las fases iniciales y terminales de la succión [56]. Durante los primeros seis meses de vida los lactantes realizaron el control de salud pediátrico mensual habitual, en el que se registraron las medidas de peso, talla y pliegues cutáneos.

3.2 Determinación de variables bioquímicas.

Obtención, fraccionamiento y almacenamiento de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron en el laboratorio del IDIP. La muestra se dividió en 2 fracciones: 1 a 3 ml se recogieron en un tubo con heparina para la obtención de plasma para realizar las determinaciones de hormonas. El resto se recogió en un tubo con EDTA para la obtención de CMSP. El plasma se congeló a -20°C hasta su procesamiento, mientras que las CMSP se separaron en forma inmediata.

Determinación de leptina en plasma.

La determinación cuantitativa de leptina en plasma se realizó en el laboratorio del IDIP por enzimoinmunoensayo (ELISA). Se utilizó el kit comercial Human Leptin ELISA DuoSet (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de insulina y cortisol en plasma.

Las determinaciones de insulina y cortisol en plasma se realizaron mediante un ensayo inmunoenzimático de unión competitiva de quimioluminiscencia de partículas paramagnéticas utilizando un equipo automatizado Access Beckman Coulter. Las mismas son realizadas rutinariamente por el Laboratorio de Endocrinología de la Sala de Bioquímica Especializada, del Laboratorio Central del Hospital de Niños de La Plata.

Análisis de las muestras de leche materna.

Las muestras de leche se centrifugaron durante 20 minutos a 3000g para separar la fracción grasa. En la fase acuosa (leche descremada) diluida al medio se midieron las hormonas como se indica para las muestras de plasma. [57].

Aislamiento de CMSP. Extracción de RNA. Determinación de la expresión génica de LEPR y SOCS3 por real time PCR.

Esta parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Niños "Sor María Ludovica". Las CMSP se aislaron a partir de las muestras de sangre usando un gradiente de Ficoll (Sigma-Aldrich, Histopaque 1077). Se aisló el ARN total de las CMSP usando reactivo TRIzol (Invitrogen). La integridad de las muestras de ARN se determinó en geles de agarosa (1,8%) y espectrofotométricamente usando la relación de absorción a 260/280 nm (NanoDrop). Para la eliminación de cualquier contaminación residual de ADN, las muestras de ARN se preincubaron con DNAasa I (Promega, Madison, WI) a 37°C durante 25 minutos y luego se inactivaron a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se realizó la retrotranscripción de 1 ug de ARN a cDNA mediante la enzima MMLV (Invitrogen). Para la PCR cuantitativa (StepOne, AppliedBiosystems) se aplicó el método SyBR Green como se ha reportado anteriormente por nuestro grupo [58, 59] utilizando la master mix SsoAdvanced Unuiversal Sybr Green Supermix (Biorad) y primers de LEPR y SOCS3 diseñados con el software Vector NTI (Invitrogen). La expresión de los genes evaluados se refirió al gen housekeeping de L19. La expresión génica relativa se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta CT}$ [60].

3.3 Determinación de variables antropométricas maternas:

IMC: La valoración del peso materno (Kg) se realizó con vestimenta liviana empleando balanza digital con bioimpedancia Omron HBF514, mientras que la medición de la talla (cm) se realizó de pie, descalza, con los pies juntos y los brazos relajados a los lados del

cuerpo, manteniendo la cabeza en el plano de Frankfort, utilizando un estadiómetro portátil (SECA S-213). Con ambas mediciones se estimó el IMC.

Índice cintura cadera: la circunferencia de cintura corresponde a la medición alrededor del cuerpo al nivel del abdomen y justo por encima del hueso de la cadera, que se toma inmediatamente después de la exhalación. La circunferencia de cadera corresponde a la medición alrededor del cuerpo al nivel de la cadera en la mayor circunferencia de las nalgas. Ambas mediciones se tomaron con una cinta no elástica a nivel paralelo al piso y se expresaron en centímetros. El ICC se calculó como el cociente entre ambos.

Composición corporal: los porcentajes de grasa corporal total, masa muscular y nivel relativo de grasa visceral se determinaron mediante el método de impedancia bioeléctrica utilizando una balanza Omron HBF514.

Perímetro braquial (PB): se midió del lado derecho con el paciente de pie con brazo descubierto y relajado al costado del cuerpo. El investigador se ubica de frente, rodeando con la cinta métrica a la altura del punto medio que une el acromion y olécranon. Previamente se marca el punto medio del brazo con el mismo a 45°.

Porcentaje de masa grasa subcutánea: La masa grasa se estimó a partir de la medición de los siguientes pliegues cutáneos empleando un calibre Lange (1 mm de precisión):

- Pliegue tricipital (PT): en la cara posterior del brazo no dominante, en el punto medio entre el acromion y el olecranon.
- Pliegue bicipital (PBi): sobre la cara anterior del brazo no dominante, sobre la porción media del bíceps.
- Pliegue subescapular (PSE): en el ángulo inferior de la escápula, con un eje de 45° con respecto a la columna vertebral.
- Pliegue suprailíaco (PSI): por encima de la cresta ilíaca ántero-superior, formando un ángulo de 45° con la línea inguinal media.

El porcentaje de MG se calculó través de la ecuación de Siri [61]: MG (%) = [(4,95 / DC) – 4,5] * 100.

Dónde: Densidad Corporal (DC) = C – M x log (PT+PB+PSE+PSU) [62].

C y M: coeficientes obtenidos por hidrodensitometría.

3.4 Determinación de variables antropométricas infantiles:

Las mediciones corporales infantiles las realizaron los pediatras del IDIP.

Peso: los lactantes se pesaron con balanza electrónica digital modelo Tanita UM-061 con divisiones de 100 g y capacidad máxima de 14 kg. El peso se tomó con el mínimo de ropa posible y sin calzado.

Talla: se tomó en decúbito supino. Se coloca al niño en posición decúbito supino sobre una superficie horizontal plana con ayuda de un adulto. El ayudante mantiene la cabeza en contacto con el extremo cefálico de dicha superficie, contra el plano vertical fijo. La cabeza del niño debe colocarse con el plano de Frankfürt paralelo a la barra fija. El observador que mide al niño estira las piernas de éste y mantiene los pies en ángulo recto, deslizando la superficie vertical móvil hasta que esté firmemente en contacto con los talones del niño, efectuándose entonces la lectura hasta el último milímetro completo (0,1 cm).

Perímetro braquial: se midió del lado derecho con el paciente con brazo descubierto y relajado al costado del cuerpo, rodeando con la cinta métrica a la altura del punto medio que une el acromion y olécranon.

Porcentaje de masa grasa subcutánea: se estima a partir de la medición de los pliegues cutáneos (PT, PBi, PSE) empleando un calibre Lange (1 mm de precisión), evaluados según referencias de pliegue/edad de la OMS para niños [63].

Los datos antropométricos infantiles (peso, talla, IMC, perímetro braquial y pliegues cutáneos) también se expresaron como puntaje z y se evaluaron según las tablas propuestas por la OMS para menores de 5 años [64].

3.5 Aspectos éticos.

Este trabajo fue aprobado por parte del Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación del IDIP. El proyecto se desarrollará conforme a los principios proclamados en la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (UNESCO 2005), la declaración de Helsinki de 2005 y su revisión de Fortaleza (2013), las Guías Operacionales para Comités de Ética que Evalúan Protocolos (OMS 2000) y la Ley 11044 de la Provincia de Buenos Aires (Aspectos éticos de la investigación en seres humanos), entre otras, y sus sucesivas enmiendas y clarificaciones. Se prestará especial atención a lo normado por la Ley Nacional 25326 de Protección de Datos Personales. La recolección de datos personales se realizará de acuerdo al artículo 3°, mediando en todos los casos la autorización escrita en la que constará el consentimiento libre y expreso de los padres y/o tutores. A los padres y/o tutores de los pacientes incluidos se les explicarán de forma clara los objetivos de la investigación y la posibilidad de que sus hijos participen del mismo. Todos los participantes han firmado en conformidad un consentimiento informado confeccionado a tal fin.

3.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico R, versión 3.6.1. Las variables cualitativas se informan como frecuencia (%) y las cuantitativas como media ± desvío o mediana (IQR) según corresponda. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para examinar la normalidad de las variables cuantitativas. Para comparar variables cuantitativas entre grupos se utilizó el de test de Student o de Mann-Whitney según corresponda. Para estudiar la relación entre dos variables cuantitativas se utilizaron las correlaciones de Pearson o Spearman según corresponda. En todos los casos, se considerará significativo un p-valor menor a 0.05.

RESULTADOS

Reclutamiento de voluntarias.

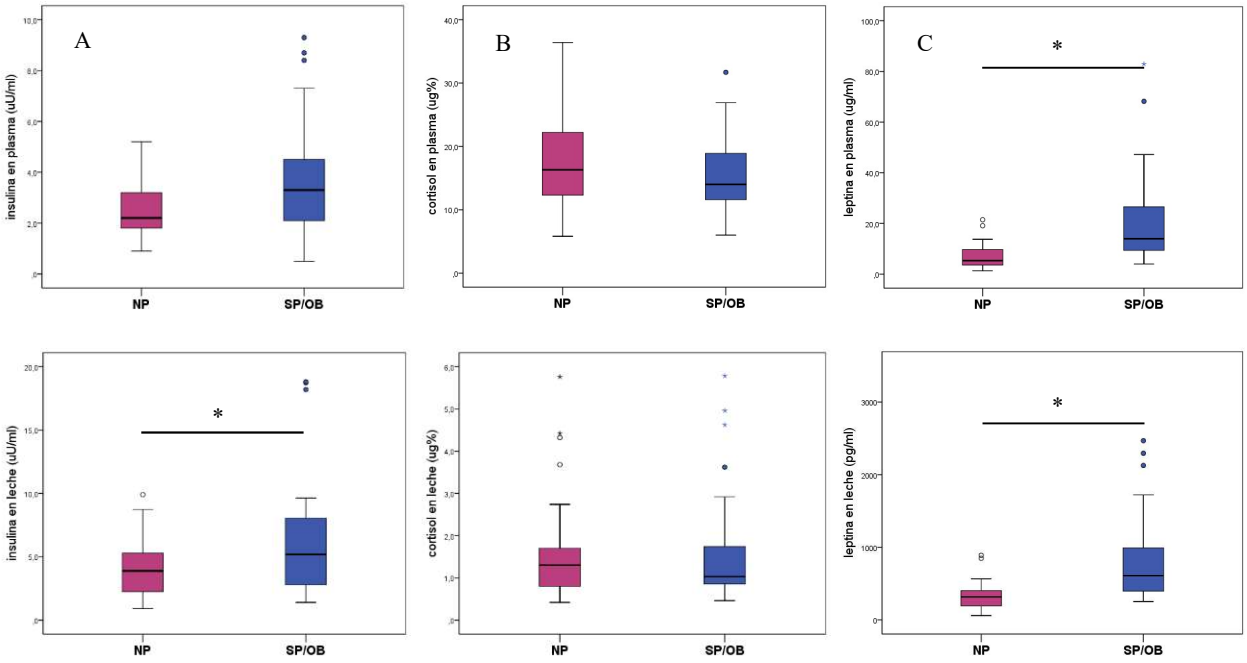
Se reclutaron 68 diadas madre/hijo, participantes que llegan al consultorio materno del IDIP para la primera consulta neonatal del niño. En el postparto temprano (10 días) se recolectaron muestras de sangre materna en las que se realizaron análisis de hormonas circulantes (insulina, leptina y cortisol) y el aislamiento de CMSP y muestras de leche en las que se determinó la concentración de insulina, leptina y cortisol. De las 68 madres reclutadas para el estudio, 34 presentaron sobrepeso u obesidad pregestacional (grupo SP/OB) y 34 eran normopesas (grupo NP). No hubo diferencias estadísticas en la ganancia de peso durante el embarazo entre los grupos. Como se esperaba, el IMC, las

circunferencias de cintura y cadera, el perímetro braquial, los porcentajes de grasa corporal total, grasa visceral y grasa subcutánea fueron significativamente superiores en las madres con SP/OB pregestacional (data no mostrada). Los hijos de las madres pertenecientes a ambos grupos no presentaron diferencias de peso, adiposidad ni talla desde el nacimiento hasta los seis meses de edad. Completaron el protocolo hasta los 6 meses 25 díadas del grupo NP y 22 del grupo SP/OB.

Análisis del ambiente hormonal en el postparto temprano.

Las concentraciones de insulina, cortisol y leptina en plasma y en leche materna se pueden ver en la Fig. 2. Los niveles de insulina circulantes mostraron una tendencia a ser superiores en madres con SP/OB pregestacional (p=0.084), mientras que los niveles en leche fueron significativamente superiores (p=0.0021). Las concentraciones de cortisol no difirieron en madres con SO/OB vs madres con NP. Los niveles de leptina fueron más elevados en madres con SP/OB pregestacional tanto en plasma como en leche materna (p<0.001).

Fig. 2: concentraciones de insulina (A), cortisol (B) y leptina (C) en plasma (arriba) y en leche materna (abajo).



Diferencias entre madres con normopeso (NP) y con sobrepeso/obesidad (SP/OB) analizadas mediante test de Mann-Whitney. * p<0,005.

Las concentraciones de las tres hormonas en plasma se asociaron en forma positiva y muy significativa con las respectivas concentraciones en leche (Tabla 1) en madres con NP y con SP/OB pregestacional.

Tabla 1: Correlaciones de Spearman entre las concentraciones plasmáticas y en leche materna de insulina, cortisol y leptina.

	General		NP		SP/OB	
	r	p	R	p	r	p
Insulina	0.480**	0.000	0.429*	0.011	0.483**	0.004
Cortisol	0.566**	0.000	0.696**	0.000	0.427*	0.013
Leptina	0.834**	0.000	0.638**	0.008	0.762**	0.000

* p<0,05; **p<0.01

Como se aprecia en la Tabla 2, las concentraciones plasmáticas de leptina e insulina se asociaron positivamente con todos los parámetros antropométricos maternos medidos en el postparto temprano, siendo las correlaciones más fuertes para la leptina. La concentración de leptina en leche también se asoció positivamente con estos parámetros antropométricos, excepto con el ICC, y la insulina en leche sólo se correlacionó con el IMC, la circunferencia de cintura y el porcentaje de grasa visceral. El cortisol plasmático y en leche no se asoció con la antropometría materna. Las correlaciones entre los niveles de hormonas y el IMC pregestacional y en el postparto temprano fueron similares.

Tabla 2: Correlaciones de Spearman entre hormonas en plasma y leche y parámetros antropométricos maternos en el postparto temprano.

	Insulina plasmática	Insulina en leche	Cortisol plasmático	Cortisol en leche	Leptina plasmática	Leptina en leche
IMC PG						
r	0,266*	0,237*	-0,165	-0,038	0,561**	0,504**
p	0,030	0,050	0,183	0,761	0,000	0,000
IMC PPt						
r	0,286*	0,283*	-0,165	-0,142	0,599**	0,619**
p	0,019	0,019	0,183	0,248	0,000	0,000
Circunferencia de cintura						
r	0,343**	0,276*	-0,087	-0,093	0,541**	0,653**
p	0,005	0,025	0,492	0,456	0,000	0,000
Circunferencia de cadera						
r	0,258*	0,241	-0,059	-0,047	0,546**	0,692**
p	0,038	0,051	0,641	0,710	0,000	0,000
ICC						
r	0,274*	0,171	-0,192	-0,140	0,321*	0,291
p	0.027	0,169	0,126	0,262	0,038	0,052

Perímetro braquial						
r	0,260*	0,143	0,023	0,025	0,469**	0,572**
p	0,035	0,248	0,855	0,841	0,002	0,000
Grasa subcutánea						
r	0,315*	0,194	-0,063	-0,108	0,569**	0,652**
p	0,012	0,125	0,623	0,396	0,000	0,000
Grasa corporal total						
r	0,288*	0,207	-0,144	0,003	0,561**	0,611**
p	0,018	0,091	0,244	0,981	0,000	0,000
Grasa visceral						
r	0,291*	0,340**	-0,128	-0,074	0,435**	0,538**
p	0,017	0,005	0,302	0,549	0,003	0,000

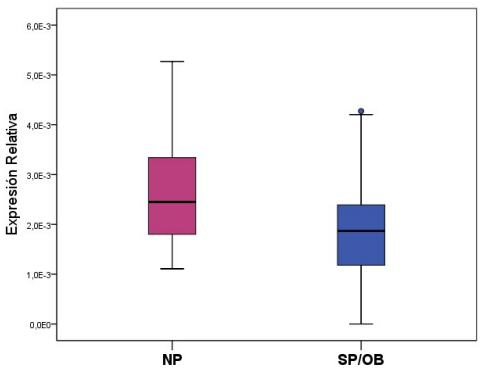
* p<0,05; **p<0.01. IMC PG: índice de masa corporal pregestacional. IMC PPt: índice de masa corporal en el postparto temprano.

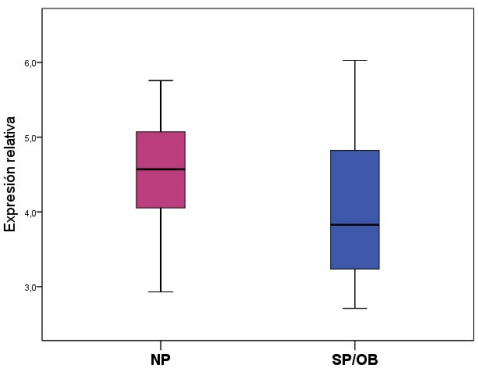
Análisis de la expresión génica en CMSP en el postparto temprano.

Los niveles de expresión génica de LEPR y SOCS3 en CMSP se pueden ver en la Fig. 3. La expresión de LEPR fue significativamente inferior en madres con SP/OB pregestacional (p=0.037), mientras que la de SOCS3 no presentó diferencias entre grupos. No se observaron asociaciones significativas entre los niveles de expresión génica y las concentraciones de leptina en plasma o leche ni con parámetros antropométricos maternos.

Figura 3: niveles de expresión génica de LEPR (A) y SOCS3 (B) en CMSP maternas en el postparto temprano.

A



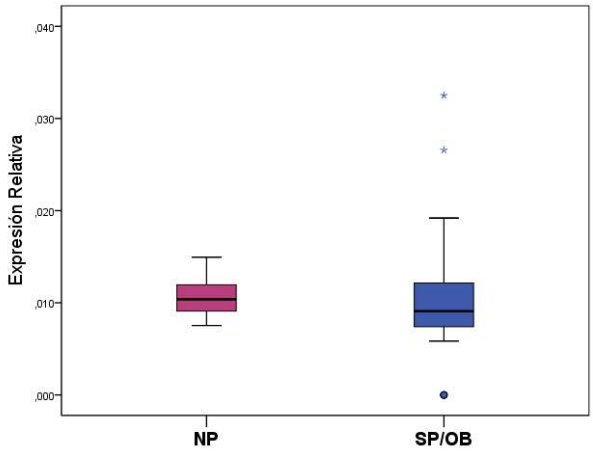


B

Diferencias entre madres con normopeso (NP) y con sobrepeso/obesidad (SP/OB) analizadas mediante test de Mann-Whitney. * p<0,005

Los niveles de expresión génica de InsR en CMSP se pueden ver en la Fig. 4. La expresión de InsR no fue diferente en madres con SP/OB pregestacional vs madres con NP. No se observó asociación con los niveles de insulina en plasma o leche. Respecto a los parámetros antropométricos maternos, se observó asociación negativa con el ICC (r=-0.425, p=0.004).

Figura 4: niveles de expresión génica de InsR en CMSP maternas en el postparto temprano.



Análisis de las correlaciones entre el ambiente hormonal y los niveles de expresión génica en CMSP de la madre y el crecimiento del niño.

Las concentraciones de hormonas maternas y la expresión génica de sus receptores en CMSP se relacionaron con el crecimiento del niño. Particularmente, el cortisol se correlacionó de manera negativa con el perímetro braquial a los 15 ds de edad y de manera positiva con la adiposidad a los 6 meses de edad (Tabla 3). La leptina se correlacionó positivamente con la talla a los 15 ds y 6 meses de edad y con el perímetro braquial a los 6 meses (Tabla 4) mientras que la expresión de LepR se asoció en forma positiva con el peso, IMC y adiposidad 6 meses de edad, mostrando una tendencia similar pero no significativa a los 15 ds de edad (Tabla 5). Ni la insulina en plasma o leche ni la expresión de su receptor en CMSP se asociaron con parámetros de crecimiento del niño.

Similares resultados se hallaron con respecto al IMC, los pliegues, la talla y el perímetro braquial de los niños expresados como puntaje z (data no mostrada).

Tabla 3: Correlaciones de Spearman entre cortisol en plasma y leche y parámetros antropométricos del niño.

	15 ds de edad		6 meses de edad			
	Perímetro braquial		Pliegue tricipital		Pliegue subescapular	
	r	p	r	p	r	p
Cortisol plasmático	-0.275*	0.024	0.525*	0.017	0.577**	0.008
Cortisol en leche	-0.249*	0.040				

* p<0,05; **p<0.01

Tabla 4: Correlaciones de Spearman entre leptina en plasma y leche y parámetros antropométricos del niño.

	15 ds de edad		6 meses de edad			
	Talla		Talla		Perímetro braquial	
	r	p	r	p	r	p
Leptina plasmática	0,287	0.059	0.378*	0.036	0.454	0.058
Leptina en leche	0.284	0.053	0.350*	0.050	0.582*	0.011

* p<0,05

Tabla 5: Correlaciones de Pearson entre LEPR en CMSP maternas y parámetros antropométricos del niño.

LEPR	r	p
15 ds de edad		
Peso	0.274	0.063
IMC	0.252	0.088
Pliegue tricipital	0.303*	0.039
Pliegue subescapular	0.263	0.075
6 meses de edad		
Peso	0.367*	0.039
IMC	0.376*	0.034
Pliegue tricipital	0.557*	0.016
Pliegue subescapular	0.627**	0.005

* p<0,05

DISCUSIÓN

La leche humana exhibe una variación individual sustancial en la concentración de hormonas reguladoras del apetito, niveles de citoquinas, perfiles de ácidos grasos y otros factores, y su composición depende de factores como el estado nutricional materno y a la vez regulan el crecimiento del lactante [5, 6]. Modelos animales han proporcionado evidencia de que la obesidad materna puede alterar los niveles de leptina, la insulina y otros elementos bioactivos de la leche, que a su vez están asociados con diabetes, obesidad y esteatosis hepática en la edad adulta [65, 66]. Por ello se necesitan estudios en humanos para probar la hipótesis de la "programación de la lactancia"; es decir, la variación en los niveles de hormonas, citoquinas y otros compuestos bioactivos presentes en la leche materna puede tener efectos sostenidos sobre la descendencia [57]. Nuestros resultados muestran que las concentraciones de leptina, insulina y cortisol en leche se asocian a los niveles de hormonas circulantes y que la insulina y la leptina se correlacionan con la antropometría materna, particularmente con la grasa corporal, a diferencia del cortisol. Los niveles de expresión de LEPR en CMSP maternas funcionan como biomarcadores útiles asociados al crecimiento del niño.

La leptina es una hormona reguladora del apetito producida en el tejido adiposo y en las células epiteliales de la glándula mamaria [24-27], y nuestros resultados muestran que se encuentra en concentraciones superiores en el plasma en comparación con la leche materna y en mujeres con obesidad que aquellas con normopeso, en consonancia con otros autores [57, 67, 68]. La asociación positiva de la leptina en plasma y leche materna con el IMC y otros parámetros antropométricos maternos ha sido previamente establecida [31, 36, 57]. Nuestros resultados confirman esta asociación en el postparto temprano en mujeres que amamantan en forma exclusiva. La leptina de la leche deriva en gran parte del plasma materno, cuyo nivel se asocia con los cambios en la adiposidad [57]; esto puede explicar su asociación con la adiposidad materna (total, visceral y subcutánea) así como con el IMC.

La leptina en leche materna es uno de los componentes que regula el crecimiento del niño. Nuestros resultados muestran una asociación positiva y moderada con la talla del niño y el perímetro braquial a los 6 meses de edad, cuya tendencia se observa desde los 15 días de edad. Estudios anteriores han investigado la asociación entre la leptina de la leche materna y el crecimiento infantil. Varios estudios no identificaron una asociación entre la leptina de la leche materna y el crecimiento del niño [56, 69, 70], mientras que otros encontraron una relación inversa entre la leptina de la leche materna y el aumento de peso, la talla y la masa grasa del niño durante los dos primeros años de vida [17, 18, 29, 71-74]. La discordancia con nuestros resultados puede deberse a varios factores. Por un lado, algunos autores expresan la correlación entre la concentración de leptina en leche mientras que otros calculan la ingesta diaria de la hormona en función de la ingesta de leche por parte del lactante, encontrando esta última positivamente asociada a la masa grasa del lactante [75]. Por otro lado, los análisis de datos realizados fueron diferentes, ya que en nuestro caso para analizar la relación entre las variables cuantitativas se utilizaron las correlaciones de Pearson o Spearman, y reportes de otros autores han utilizado modelos de regresión lineal ajustando por variables como sexo del lactante o meses de lactancia. Futuros análisis de nuestros datos se centrarán en este tipo de modelos.

La resistencia a la leptina se refiere a los estados en los que esta hormona no logra promover sus efectos anticipados, coexistiendo frecuentemente con hiperleptinemia marcada [38]. La evaluación de la resistencia a la leptina abarca diversos aspectos, siendo el marcador bioquímico estándar la fosforilación de STAT3 inducida por leptina [76]. La hiperleptinemia asociada a la obesidad se acompaña frecuentemente de una expresión hipotalámica reducida de LEPR en varios modelos animales [77]. En este sentido, la hiperleptinemia crónica inducida por sobreexpresión transgénica disminuye los niveles de LEPR hipotalámicos y altera la señalización de leptina [78]. Al ser estos estudios inaccesibles en la práctica clínica, la búsqueda de biomarcadores nutrigenómicos como la expresión de LEPR y SOCS3 en CMSP cobra relevancia para objetivar la sensibilidad a leptina de los pacientes con obesidad. Nuestros resultados muestran que la expresión génica de LEPR disminuye en madres con SP/OB junto con el incremento de los niveles de leptina en plasma y en leche materna, lo que reflejaría un estado de resistencia a la leptina característico de la obesidad. Nuestros resultados también demuestran que las CMSP podrían reflejar la expresión hipotalámica de este receptor. Aunque no muchos trabajos han estudiado la expresión de estos biomarcadores en CMSP, resultados similares se han encontrado en adolescentes con obesidad [79], mientras que en niños con obesidad se ha reportado un incremento en la expresión de LEPR [53]. A pesar de que no hallamos correlación con las concentraciones de leptina en plasma o leche ni con parámetros antropométricos maternos, la expresión de LEPR en CMSP maternas en el postparto temprano se asoció de forma moderada a fuerte tanto con el crecimiento como

con la adiposidad del niño, particularmente a los 6 meses de edad. Esto destaca la utilidad de la medición de LEPR materno como herramienta útil y de fácil acceso para la detección temprana y prevención de enfermedades asociadas al sobrepeso. Estudios longitudinales ayudarían a determinar si puede usarse como biomarcador del estado metabólico del individuo.

Producida en el páncreas, la insulina juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y la función metabólica, pero también tiene funciones menos reconocidas en la supresión del apetito a través de la unión a receptores en las neuronas hipotalámicas [13] y como una potente hormona reguladora del crecimiento en los primeros años de vida [80]. En concordancia con otros autores [81-83], nuestros resultados muestran niveles superiores de insulina en el postparto temprano en leche de madres con SP/OB, con una tendencia similar en plasma. La concentración de insulina en la leche se encuentra en concentraciones equimolares con el plasma materno, y se cree que es transportada activamente a la leche por las células epiteliales mamarias [16]. Al igual que la leptina, se asoció positivamente con el IMC y la adiposidad materna, pero las correlaciones fueron más débiles, ya que esta hormona no refleja cambios en la adiposidad tan fielmente como la leptina. Los hallazgos previos sobre la relación de la insulina en leche con la antropometría materna son escasos y discordantes. Nuestros resultados son consistentes con varios otros estudios que informan una correlación positiva con el IMC pregestacional [57] y en la lactancia [16, 83]. Otros autores [84] reportaron que el IMC en el postparto temprano no afecta la concentración de insulina en la leche. Al igual que con el IMC y en concordancia con otros autores [31, 85], los niveles de insulina en la leche se correlacionaron con la grasa visceral y la circunferencia de cintura, destacando el papel de la grasa corporal materna en la composición de la leche. Nuestros resultados justifican una mayor investigación sobre el papel potencial de la insulina de la leche en el apetito infantil y el riesgo de obesidad. A diferencia de la leptina, la insulina en leche ni en plasma materno no se asoció con el crecimiento del niño, en concordancia con otros autores [18, 81]. A diferencia del LEPR en CMSP, la expresión de InsR no difirió en madres con SP/OB, no se asoció a parámetros antropométricos maternos ni con niveles de insulina en plasma o leche ni con el crecimiento del niño, por lo que su utilidad como biomarcador de la señalización de la insulina en la madre o en el niño es escasa.

Otro grupo importante de hormonas presentes en la leche humana son los glucocorticoides, el cortisol y la cortisona, involucrados en la regulación de la homeostasis metabólica y la inflamación. Se ha demostrado que los glucocorticoides se transfieren predominantemente de la circulación materna a la leche, pero se han estudiado muy poco las funciones biológicas potenciales de los glucocorticoides derivados de la leche humana sobre el desarrollo del lactante. Nuestros resultados muestran que el cortisol de la leche está altamente asociado con la concentración de cortisol en plasma, como fuera reportado también por otros autores [86]. Por otro lado, nuestros resultados no muestran diferencias en los niveles de cortisol en plasma ni en leche de madres con SP/OB ni asociación con parámetros antropométricos maternos, en línea con los resultados de Lindberg y col [87]. Mezzullo y col reportaron niveles inferiores en circulación en mujeres con obesidad [88]. En contraste con nuestros resultados, Pundir y col [89] reportaron una asociación positiva entre el cortisol en leche y el IMC materno, pero no con la adiposidad. Diferencias en el horario de la toma de muestras y los métodos utilizados en el análisis de cortisol (quimioluminiscencia vs HPLC-MSMS) podrían explicar las diferencias. Los glucocorticoides en leche se han asociado tanto con resultados conductuales como el temperamento infantil [23, 90] como con el crecimiento

y adiposidad [22]. Nuestros resultados muestran que el cortisol en plasma materno se asocia al perímetro braquial en el postparto temprano, pero predice positivamente la adiposidad a los 6 meses de edad, en concordancia con otros autores [89].

CONCLUSIÓN

A partir de nuestros resultados podemos concluir que las hormonas metabólicas reguladoras de la ingesta y el peso corporal, particularmente la insulina y la leptina, están presentes en leche materna con fuerte asociación a sus niveles circulantes, dependiendo de la composición corporal materna, particularmente de la adiposidad, e impactando en el crecimiento y adiposidad del niño. Las CMSP maternas pueden funcionar como fuente de biomarcadores nutrigenómicos tempranos, tanto en la madre (asociados a la resistencia a la leptina) como en el niño (asociado a la adiposidad).

Es importante realizar estudios enfocados en la generación de conocimiento sobre el papel de los compuestos bioactivos secretados en la leche humana para evaluar las consecuencias de las variaciones interindividuales en la síntesis de leche y los efectos de estas hormonas sobre en la salud y el desarrollo del lactante involucrando a la diada madre-hijo al menos durante el primer año de vida.

REFERENCIAS

[1] Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. Obesity (Silver Spring). 2006;14 Suppl 1:1S-8S.

[2] Patel S, Hawkley LC, Cacioppo JT, Masi CM. Dietary fiber and serum 16alpha-hydroxyestrone, an estrogen metabolite associated with lower systolic blood pressure. Nutrition. 2011;27:778-81.

[3] Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/satiety. Annals of nutrition & metabolism. 2014;64 Suppl 1:36-44.

[4] Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311. [En línea] Centro de Prensa - Organización Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud.; 2017.

[5] Savino F, Liguori SA, Fissore MF, Oggero R. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. International journal of pediatric endocrinology. 2009;2009:327505.

[6] Vickers MH. Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. Annals of nutrition & metabolism. 2014;64 Suppl 1:26-34.

[7] Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Developmental Regulators for the Infant and the Mother. International journal of environmental research and public health. 2015;12:13981-4020.

[8] Wada Y, Lonnerdal B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. The Journal of nutritional biochemistry. 2014;25:503-14.

[9] Chowanadisai W, Lonnerdal B. Alpha(1)-antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: origin, concentrations, and stability. The American journal of clinical nutrition. 2002;76:828-33.

[10] Lonnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. The Journal of pediatrics. 2010;156:S26-30.

[11] Davidson LA, Lonnerdal B. Fecal alpha 1-antitrypsin in breast-fed infants is derived from human milk and is not indicative of enteric protein loss. Acta paediatrica Scandinavica. 1990;79:137-41.

[12] Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Oggero R. Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? Clinical endocrinology. 2009;71:757-65.

[13] Woods SC, Seeley RJ. Insulin as an adiposity signal. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2001;25 Suppl 5:S35-8.

[14] Jovanovic-Peterson L, Fuhrmann K, Hedden K, Walker L, Peterson CM. Maternal milk and plasma glucose and insulin levels: studies in normal and diabetic subjects. Journal of the American College of Nutrition. 1989;8:125-31.

[15] Ahuja S, Boylan M, Hart S, Román-Shriver C, Spallholz J, Pence B, et al. Glucose and Insulin Levels are Increased in Obese and Overweight Mothers' Breast-Milk. Food and Nutrition Sciences. 2011;2:5.

[16] Whitmore TJ, Trengove NJ, Graham DF, Hartmann PE. Analysis of insulin in human breast milk in mothers with type 1 and type 2 diabetes mellitus. International journal of endocrinology. 2012;2012:296368.

[17] Fields DA, Demerath EW. Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition. Pediatric obesity. 2012;7:304-12.

[18] Fields DA, George B, Williams M, Whitaker K, Allison DB, Teague A, et al. Associations between human breast milk hormones and adipocytokines and infant growth and body composition in the first 6 months of life. Pediatric obesity. 2017;12 Suppl 1:78-85.

[19] Hamosh M. Bioactive factors in human milk. Pediatric clinics of North America. 2001;48:69-86.

[20] Angelucci L, Patacchioli FR, Scaccianoce S, Di Sciullo A, Cardillo A, Maccari S. A model for later-life effects of perinatal drug exposure: maternal hormone mediation. Neurobehavioral toxicology and teratology. 1985;7:511-7.

[21] Carter M, Dudley D, Nathanielsz P. Fetal cortisol is evaluated in maternal obesity (MO). Reprod Sci. 2011;18:139.

[22] Hahn-Holbrook J, Le TB, Chung A, Davis EP, Glynn LM. Cortisol in human milk predicts child BMI. Obesity (Silver Spring). 2016;24:2471-4.

[23] Hinde K, Skibiel AL, Foster AB, Del Rosso L, Mendoza SP, Capitanio JP. Cortisol in mother's milk across lactation reflects maternal life history and predicts infant temperament. Behavioral ecology : official journal of the International Society for Behavioral Ecology. 2015;26:269-81.

[24] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature. 1996;382:250-2.

[25] Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94:11073-8.

[26] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nature medicine. 1997;3:1029-33.

[27] Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1998;83:1810-3.

[28] Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1997;82:4270-3.

[29] Miralles O, Sanchez J, Palou A, Pico C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. Obesity (Silver Spring). 2006;14:1371-7.

[30] Savino F, Fissore MF, Grassino EC, Nanni GE, Oggero R, Silvestro L. Ghrelin, leptin and IGF-I levels in breast-fed and formula-fed infants in the first years of life. Acta Paediatr. 2005;94:531-7.

[31] Chan D, Goruk S, Becker AB, Subbarao P, Mandhane PJ, Turvey SE, et al. Adiponectin, leptin and insulin in breast milk: associations with maternal characteristics and infant body composition in the first year of life. Int J Obes (Lond). 2017.

[32] Badillo-Suarez PA, Rodriguez-Cruz M, Nieves-Morales X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. Journal of mammary gland biology and neoplasia. 2017;22:171-91.

[33] Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. The Journal of endocrinology. 2009;200:293-300.

[34] Houseknecht KL, McGuire MK, Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. Biochemical and biophysical research communications. 1997;240:742-7.

[35] Misra VK, Trudeau S. The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy. Obesity (Silver Spring). 2011;19:416-21.

[36] Andreas NJ, Hyde MJ, Gale C, Parkinson JR, Jeffries S, Holmes E, et al. Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: a systematic review. PloS one. 2014;9:e115043.

[37] Castillo-Laura H, Santos IS, Quadros LC, Matijasevich A. Maternal obesity and offspring body composition by indirect methods: a systematic review and meta-analysis. Cadernos de saude publica. 2015;31:2073-92.

[38] Andreoli MF, Donato J, Cakir I, Perello M. Leptin resensitisation: a reversion of leptin-resistant states. The Journal of endocrinology. 2019;241:R81-R96.

[39] Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. Endocrinology. 2004;145:4880-9.

[40] Blundell JE, Goodson S, Halford JC. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2001;25 Suppl 1:S29-34.

[41] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. The New England journal of medicine. 1996;334:292-5.

[42] D'Souza A M, Neumann UH, Glavas MM, Kieffer TJ. The glucoregulatory actions of leptin. Molecular metabolism. 2017;6:1052-65.

[43] Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. The Journal of comparative neurology. 2005;493:63-71.

[44] Myers MG, Jr., Munzberg H, Leinninger GM, Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. Cell metabolism. 2009;9:117-23.

[45] Bories G, Caiazzo R, Derudas B, Copin C, Raverdy V, Pigeyre M, et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. Diabetes & vascular disease research. 2012;9:189-95.

[46] Konieczna J, Sanchez J, van Schothorst EM, Torrens JM, Bunschoten A, Palou M, et al. Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. Genes & nutrition. 2014;9:366.

[47] Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, et al. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. Biochemical and biophysical research communications. 2007;361:379-84.

[48] Caimari A, Oliver P, Keijer J, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. Omics : a journal of integrative biology. 2010;14:129-41.

[49] Caimari A, Oliver P, Rodenburg W, Keijer J, Palou A. Slc27a2 expression in peripheral blood mononuclear cells as a molecular marker for overweight development. Int J Obes (Lond). 2010;34:831-9.

[50] Reynes B, Garcia-Ruiz E, Palou A, Oliver P. The intake of high-fat diets induces an obesogenic-like gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells, which is reverted by dieting. The British journal of nutrition. 2016;115:1887-95.

[51] Reynes B, Klein Hazebroek M, Garcia-Ruiz E, Keijer J, Oliver P, Palou A. Specific Features of the Hypothalamic Leptin Signaling Response to Cold Exposure Are Reflected in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Rats and Ferrets. Frontiers in physiology. 2017;8:581.

[52] Tsiotra PC, Pappa V, Raptis SA, Tsigos C. Expression of the long and short leptin receptor isoforms in peripheral blood mononuclear cells: implications for leptin's actions. Metabolism: clinical and experimental. 2000;49:1537-41.

[53] Sanchez J, Priego T, Pico C, Ahrens W, De Henauw S, Fraterman A, et al. Blood cells as a source of transcriptional biomarkers of childhood obesity and its related metabolic alterations: results of the IDEFICS study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2012;97:E648-52.

[54] Priego T, Sanchez J, Pico C, Ahrens W, Bammann K, De Henauw S, et al. Influence of breastfeeding on blood-cell transcript-based biomarkers of health in children. Pediatric obesity. 2014;9:463-70.

[55] Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. PloS one. 2016;11:e0154003.

[56] Ucar B, Kirel B, Bor O, Kilic FS, Dogruel N, Aydogdu SD, et al. Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM. 2000;13:149-56.

[57] Sadr Dadres G, Whitaker KM, Haapala JL, Foster L, Smith KD, Teague AM, et al. Relationship of Maternal Weight Status Before, During, and After Pregnancy with Breast Milk Hormone Concentrations. Obesity (Silver Spring). 2019;27:621-8.

[58] Andreoli MF, Stoker C, Lazzarino GP, Canesini G, Luque EH, Ramos JG. Dietary whey reduces energy intake and alters hypothalamic gene expression in obese phyto-oestrogen-deprived male rats. The British journal of nutrition. 2016;116:1125-33.

[59] Andreoli MF, Stoker C, Rossetti MF, Lazzarino GP, Luque EH, Ramos JG. Dietary withdrawal of phytoestrogens resulted in higher gene expression of 3-beta-HSD and ARO but lower 5-alpha-R-1 in male rats. Nutr Res. 2016;36:1004-12.

[60] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature protocols. 2008;3:1101-8.

[61] Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. Nutrition. 1993;9:480-91; discussion , 92.

[62] Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. The British journal of nutrition. 1974;32:77-97.

[63] WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2007.

[64] Group WMGRS. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006. p. 312.

[65] Ellsworth L, Harman E, Padmanabhan V, Gregg B. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. Reproduction. 2018;156:R23-R42.

[66] Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. Experimental diabetes research. 2011;2011:592408.

[67] Pan H, Guo J, Su Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. Physiology & behavior. 2014;130:157-69.

[68] Savino F, Sardo A, Rossi L, Benetti S, Savino A, Silvestro L. Mother and Infant Body Mass Index, Breast Milk Leptin and Their Serum Leptin Values. Nutrients. 2016;8.

[69] Uysal FK, Onal EE, Aral YZ, Adam B, Dilmen U, Ardicolu Y. Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. Clinical nutrition. 2002;21:157-60.

[70] Weyermann M, Brenner H, Rothenbacher D. Adipokines in human milk and risk of overweight in early childhood: a prospective cohort study. Epidemiology. 2007;18:722-9.

[71] Nuss H, Altazan A, Zabaleta J, Sothern M, Redman L. Maternal pre-pregnancy weight status modifies the influence of PUFAs and inflammatory biomarkers in breastmilk on infant growth. PloS one. 2019;14:e0217085.

[72] Doneray H, Orbak Z, Yildiz L. The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. Acta Paediatr. 2009;98:643-7.

[73] Brunner S, Schmid D, Zang K, Much D, Knoeferl B, Kratzsch J, et al. Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years. Pediatric obesity. 2015;10:67-73.

[74] Schuster S, Hechler C, Gebauer C, Kiess W, Kratzsch J. Leptin in maternal serum and breast milk: association with infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. Pediatric research. 2011;70:633-7.

[75] Gridneva Z, Kugananthan S, Rea A, Lai CT, Ward LC, Murray K, et al. Human Milk Adiponectin and Leptin and Infant Body Composition over the First 12 Months of Lactation. Nutrients. 2018;10.

[76] Myers MG, Jr., Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2010;21:643-51.

[77] Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R, Jr., Millard WJ. Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. Metabolism: clinical and experimental. 2000;49:1479-84.

[78] Wilsey J, Zolotukhin S, Prima V, Shek EW, Matheny MK, Scarpace PJ. Hypothalamic delivery of doxycycline-inducible leptin gene allows for reversible transgene expression and physiological responses. Gene therapy. 2002;9:1492-9.

[79] Rigamonti AE, Agosti F, De Col A, Silvestri G, Marazzi N, Bini S, et al. Severely obese adolescents and adults exhibit a different association of circulating levels of adipokines and leukocyte expression of the related receptors with insulin resistance. International journal of endocrinology. 2013;2013:565967.

[80] Susa JB, Schwartz R. Effects of hyperinsulinemia in the primate fetus. Diabetes. 1985;34 Suppl 2:36-41.

[81] Ellsworth L, Perng W, Harman E, Das A, Pennathur S, Gregg B. Impact of maternal overweight and obesity on milk composition and infant growth. Maternal & child nutrition. 2020;16:e12979.

[82] Sims CR, Lipsmeyer ME, Turner DE, Andres A. Human milk composition differs by maternal BMI in the first 9 months postpartum. The American journal of clinical nutrition. 2020;112:548-57.

[83] Young BE, Patinkin Z, Palmer C, de la Houssaye B, Barbour LA, Hernandez T, et al. Human milk insulin is related to maternal plasma insulin and BMI: but other components of human milk do not differ by BMI. European journal of clinical nutrition. 2017;71:1094-100.

[84] Shehadeh N, Khaesh-Goldberg E, Shamir R, Perlman R, Sujov P, Tamir A, et al. Insulin in human milk: postpartum changes and effect of gestational age. Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition. 2003;88:F214-6.

[85] Schneider-Worthington CR, Bahorski JS, Fields DA, Gower BA, Fernandez JR, Chandler-Laney PC. Associations Among Maternal Adiposity, Insulin, and Adipokines in Circulation and Human Milk. Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association. 2021;37:714-22.

[86] Patacchioli FR, Cigliana G, Cilumbriello A, Perrone G, Capri O, Alema GS, et al. Maternal plasma and milk free cortisol during the first 3 days of breast-feeding following spontaneous delivery or elective cesarean section. Gynecologic and obstetric investigation. 1992;34:159-63.

[87] Lindberg M, Nolvi S, Harkonen J, Aatsinki AK, Karlsson L, Karlsson H, et al. Associations between maternal socioeconomic, psychosocial and seasonal factors, infant characteristics and human milk cortisol concentrations. American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council. 2021;33:e23561.

[88] Mezzullo M, Gambineri A, Di Dalmazi G, Fazzini A, Magagnoli M, Baccini M, et al. Steroid reference intervals in women: influence of menopause, age and metabolism. European journal of endocrinology. 2021;184:395-407.

[89] Pundir S, Gridneva Z, Pillai A, Thorstensen EB, Wall CR, Geddes DT, et al. Human Milk Glucocorticoid Levels Are Associated With Infant Adiposity and Head Circumference Over the First Year of Life. Frontiers in nutrition. 2020;7:166.

[90] Nolvi S, Uusitupa HM, Bridgett DJ, Pesonen H, Aatsinki AK, Kataja EL, et al. Human milk cortisol concentration predicts experimentally induced infant fear reactivity: moderation by infant sex. Developmental science. 2018;21:e12625.

ABSTRACT

Breast milk controls the newborn´s metabolism through the transfer of bioactive compounds such as metabolic hormones, which can regulate body composition. These hormones pass from breast milk to the child's circulation without losing their structure or biological activity due to different mechanisms. Our objective was to investigate in mothers with pregestational normal weight (NW, n=34) and with overweight or obesity (OW/OB, n=34), the concentrations of leptin, insulin and cortisol in plasma and breast milk and their relationship with the growth and adiposity. We also aim to explore the usefulness of nutrigenomic biomarkers in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to

address sensitivity to leptin (leptin receptor, LEPR and suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3 gene expression) and insulin (insulin receptor, InsR gene expression).

Milk insulin and plasma and milk leptin levels were significantly higher in mothers with pregestational OW/OB. The concentrations of the three hormones in plasma were positively associated with the respective milk concentrations. Plasma leptin and insulin concentrations were positively associated with all maternal anthropometric parameters. LEPR expression in PBMC was significantly lower in mothers with pregestational OW/OB, although no associations were observed between gene expression levels and plasma or milk leptin concentrations or with maternal anthropometric variables. Cortisol positively correlated with adiposity at 6 months of age and leptin with height and arm circumference. LEPR was positively associated with weight, BMI, and adiposity at 6 months of age.

We conclude that insulin and leptin are present in breast milk and strongly association with their circulating levels, depending on maternal body composition, particularly adiposity, and affecting child´s growth and adiposity. Maternal PBMCs can function as a source of early nutrigenomic biomarkers, both in the mother (associated with leptin resistance) and in the child (associated with adiposity).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA 37 COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE LA AGRESIVIDAD AUTOINMUNE EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 1

Luz Andreone[1], Florencia Fuertes[1], Patricia Rodríguez[2], Gabriel Eiberman[2], Marcelo D. Torres Guevara[2], Fabio Palacios Porta[2], Juana Szurpik[2], Marcelo J. Perone[1]

[1] Laboratorio de Inmuno-Endocrinología, Diabetes y Metabolismo, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT – CONICET - Universidad Austral). [2] Servicio de Nutrición y Diabetes Infantil y Sección Nutrición y Diabetes Adultos, Hospital Nacional Prof. A. Posadas.

INTRODUCCIÓN

La forma prevalente de diabetes mellitus tipo 1A (DM1) se caracteriza por la destrucción parcial o total de las células β de los islotes pancreáticos por un proceso mediado por el sistema inmune. La respuesta inmune adversa durante la DM1 es inducida y promovida por la interacción de factores genéticos y ambientales. Actualmente, la DM1 afecta un número importante de individuos y su incidencia se ha incrementado notablemente en las últimas décadas. En la DM1, como consecuencia de un infiltrado crónico de leucocitos inflamatorios en los islotes de Langerhans (insulitis), existe una pérdida de la secreción de insulina y de la homeostasis de la glucosa. El tratamiento con insulina exógena es la opción terapéutica en pacientes con DM1. Sin embargo, en muchos casos no es posible lograr el estricto control de la glucemia necesario para evitar el desarrollo de daño vascular a largo plazo, asociado principalmente con retinopatía, neuropatía, y falla renal y cardíaca, frecuente en el paciente adulto.

El empleo de terapias anti-inflamatorias/inmunomoduladoras que logren controlar la autoinmunidad contra los antígenos específicos de las células β, en conjunto con la regeneración de la masa celular β perdida, podrían ser eficaces para el tratamiento y/o prevención de esta enfermedad (1-2). Si bien se conoce que diversos mecanismos actúan para disminuir o resolver la inflamación, entre la variedad de citoquinas conocidas son escasas las que han sido descriptas como moduladoras de la respuesta inflamatoria. Entre ellas podemos mencionar la IL-10 y miembros de la familia del TGF-β; sin embargo, estas citoquinas podrían contribuir también a la inflamación dependiendo del microentorno.

El miembro de la familia de IL-1 inicialmente conocido como 7b (IL-1F7b), es la variante de splicing más larga del gen que codifica IL-1F7 y, recientemente, ha sido denominada como IL-37 (3). Esta citoquina ha despertado interés por ser un importante inhibidor de la inmunidad innata (3). Ratones con expresión transgénica de IL-37 humana exhiben una importante reducción de los síntomas de colitis autoinmune inducida por dextrán sulfato sódico, injuria por isquemia-reperfusión y de inflamación atribuida a la obesidad (4-6). Asimismo, la sobre-expresión intra-articular de IL-37 disminuye los síntomas de artritis reumatoidea en un modelo de artritis inducida por colágeno (7). En un modelo de

inflamación sistémica se ha observado que la administración de IL-37 posee un efecto dual suprimiendo la inflamación y reduciendo el costo metabólico (8). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que diversos ligandos de receptores toll (TLR) y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, TNF-α, IFN-γ e IL-18, inducen la producción de IL-37 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (3, 9). Recientemente, se reportó que en PBMC y suero de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico la IL-37 se encuentra sobre-expresada (7). Asimismo, esta citoquina se encuentra elevada en tejido sinovial y plasma de pacientes con artritis reumatoidea (10). En pacientes con enfermedad de Graves, se han encontrado niveles elevados de IL-37 asociados con TNF-α, IL-6 e IL-17 y mayor actividad de la enfermedad (11). En personas sanas los niveles de IL-37 en tejido adiposo correlacionan positivamente con la sensibilidad a la insulina (6).

Por otro lado, ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen de IL-37 se han asociado a diferencias en la expresión de dicha citoquina en PBMC y a la susceptibilidad a enfermedades con componentes inflamatorios como la enfermedad de Behcet, la artritis reumatoidea, espondilitis anquilosante y artritis psoriática (12-16).

Estas observaciones, en conjunto, sugieren que la IL-37 podría ser un eslabón fundamental en el mecanismo de contra-regulación para la terminación o control de una variedad de respuestas inflamatorias. Sin embargo, la función de la IL-37 como modulador del proceso autoinmune durante el progreso de la DM1 no ha sido aún investigada. En consecuencia**, el objetivo principal del presente proyecto es evaluar la expresión de IL-37 en PBMC de pacientes con diagnóstico reciente de DM1 y analizar su correlación con indicadores inflamatorios y metabólicos.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Se analizaron muestras de sangre de 21 pacientes con diagnóstico reciente de DM1 (Hospital Nacional Prof. A. Posadas, Sección de Nutrición y Diabetes Infanto-Juvenil) y 23 controles sanos del mismo rango etario y sin antecedentes de enfermedades genéticas, autoinmunes o metabólicas. En el caso del grupo DM1, se seleccionaron pacientes ingresados a la guardia del Hospital Nacional Prof. A. Posadas y derivados a la Sección de Nutrición y Diabetes Infanto-Juvenil con diagnóstico de DM1; las muestras de sangre se extrajeron una vez estabilizado clínica y metabólicamente el paciente. El grupo control fue seleccionado entre los pacientes internados por cirugía programada en el Servicio de Ortopedia y Traumatología Infantil. El proyecto contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Posadas. Para la participación en el estudio fue solicitado el consentimiento informado de los pacientes y sus padres, ambos grupos cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión según el protocolo. Para caracterización, se realizaron diversos análisis bioquímicos en muestras de suero o plasma según corresponda.

Aislamiento y cultivo de PBMC: Las PBMC se aislaron a partir de sangre venosa (10 mL) mediante separación en gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Una fracción se analizó en fresco y otra fracción se cultivó durante 24h en RPMI completo en presencia o ausencia de LPS. Se extrajo ARN total utilizando Trizol (ThermoFisher) y se almacenó a -80˚C para la posterior evaluación de la expresión de IL-37, IL-1β, IL-33, IL-18Rα, IL-1R8, e IL-1Ra por RT-qPCR (SYBR Green). La expresión de RPL19 se analizó como control de normalización.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos se analizaron con el software Graphpad Prism 6 y se expresan como la media (±DE). Las diferencias entre grupos se compararon mediante test de Student o Mann-Whitney y las correlaciones entre variables mediante test de Pearson o Spearman, según distribución de los datos. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los principales parámetros biométricos y metabólicos obtenidos durante la caracterización de los pacientes y controles analizados. No existen diferencias entre los grupos respecto a la edad e índice de masa corporal (IMC). De acuerdo a los esperado por la patología, se observaron niveles más bajos de péptido C en el grupo de pacientes DM1 respecto al grupo control ($p<0,01$), indicando la disminución en la masa funcional de células-β. En concordancia, mientras que en el grupo control los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1C) se encontraron dentro de los parámetros normales, en el grupo de pacientes DM1 los niveles de HbA1C se encontraban aumentados ($p<0,001$), evidenciando la hiperglucemia sostenida.

Como medida del ataque autoinmune, se determinó el título de anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (anti-GAD), arrojando títulos por debajo del límite de detección del ensayo (<1 U/mL) en la totalidad de las muestras del grupo control mientras que en el grupo DM1 un 81% (17/21) de las muestras resultaron positivas. Entre los pacientes con anti-GAD positivo los títulos resultaron variables, observándose un muy alto título (>2000 U/mL) en 3 de los pacientes estudiados.

Tabla 1:	**n**	**Edad** (años)	**IMC** (kg/m^2)	**Péptido C** (ng/mL)	**HbA1C** (%)
Controles	23	9.3 ± 2.4	18.6 ± 3.0	1.36 ± 0.82	4.9 ± 0.4
Pacientes	21	9.9 ± 3.7	17.1 ± 3.9	0.51 ± 0.44	12.5 ± 2.3
p		ns	ns	**<0.01**	**<0.001**

* Valores expresados como media ± DE; valores normales HbA1C <5.7%.

No se observaron diferencias en los demás parámetros bioquímicos estudiados (hemograma, hepatograma, perfil lipídico), los cuales se encontraban dentro del rango normal para la edad en ambos grupos (datos no mostrados).

En las PBMC analizamos en primer lugar la expresión génica de IL-37, las subunidades de su receptor funcional y otras citoquinas de la familia de IL-1 en muestras tomadas al momento del aislamiento.

En las PBMC de los pacientes DM1, se observó una tendencia a una menor expresión del ARNm de IL-37 y una mayor expresión del ARNm de IL-1β respecto de los controles sanos, sin embargo, las diferencias no resultan significativas al analizar la totalidad de los controles y pacientes reclutados (Fig. 1A y B). Al observar la expresión del ARNm de IL-37 en los pacientes DM1, existen dos subgrupos claros, uno de mayor y otro de menor expresión (Fig. 1A).

Para continuar con el análisis de las vías involucradas en la señalización de IL-37 se determinaron por qPCR los niveles de expresión del ARNm de las subunidades del receptor: IL-18R1α e IL-1R8, no encontrándose diferencias significativas (Fig. 1C y D).

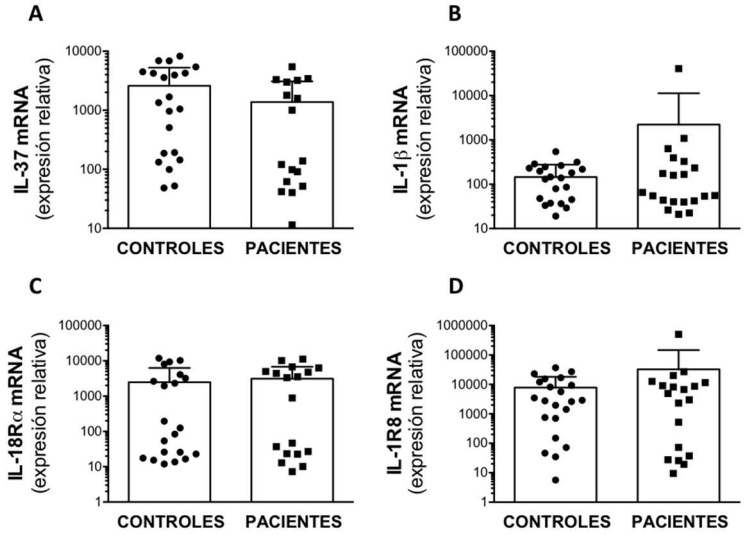


Figura 1: Expresión del ARNm de IL-37, IL-1β, IL-18R1α e IL-1R8 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). (A-D) Cuantificación relativa del ARNm de IL-37 (A), IL-1β (B), IL-18R1α (C) e IL-1R8 (D) respecto al ARNm de RPL19 en PBMC aisladas de sangre periférica de controles (n=23) y pacientes con reciente diagnóstico de DM1 (n=21).

Se analizó también la posible correlación entre los niveles de expresión de estos parámetros. Se observó una correlación positiva entre los niveles del ARNm de IL-37 y los de IL-1β (citoquina inflamatoria) en individuos sanos sugiriendo una posible contra-regulación efectiva de la señal inflamatoria; mientras que esta relación no fue observada en los pacientes con reciente diagnóstico de DM1 (Fig. 2A y B). Más aún, al analizar la expresión de IL-1β en los subgrupos de baja y alta expresión de IL-37, se observó una inversión en la relación existente entre IL-37 e IL-1β en el grupo DM1 respecto al grupo control (Fig. 3A).

En ambos grupos experimentales, se observó una correlación positiva en la expresión del ARNm de IL-18Rα respecto a la expresión del ARNm de IL-37 (Fig. 2C y D); mientras que no hubo correlación entre la expresión del ARNm de esta citoquina y la de su co-receptor IL-1R8 (Fig. 2E y F). Sin embargo, al analizar la expresión de IL-1R8 en los subgrupos de baja y alta expresión de IL-37, se observó una mayor expresión del ARNm de IL-1R8 en los subgrupos de alta IL-37 tanto en controles como en pacientes (Fig. 3B).

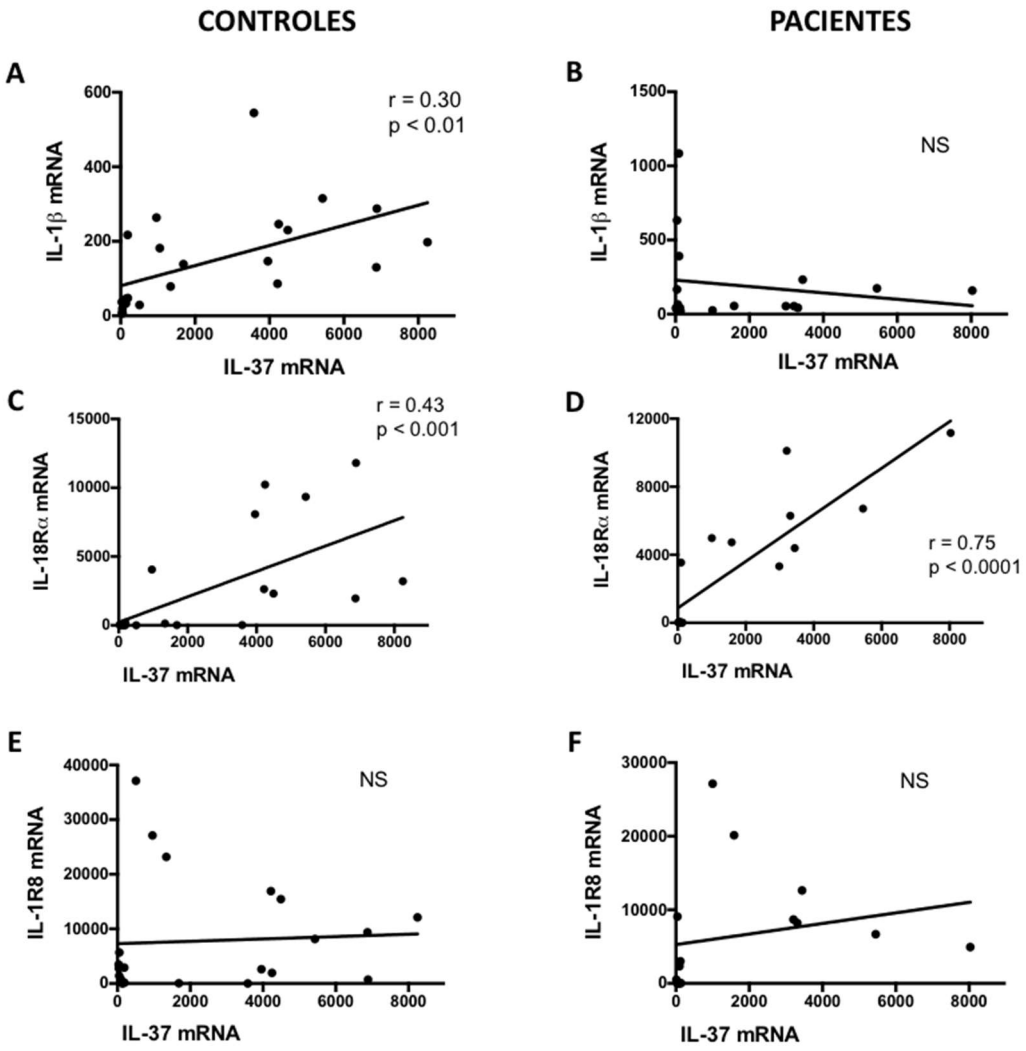


Figura 2: Análisis de correlación entre la expresión de IL-37 vs. IL-1β, IL-18Rα e IL-1R8 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Cuantificación relativa del ARNm de IL-37, IL-1β, IL-18Rα e IL-1R8 respecto al ARNm de RPL19 (control) en PBMC aisladas de sangre periférica de controles (n=23) y pacientes con reciente diagnóstico de DM1 (n=21). Se muestra la correlación de la expresión del ARNm de IL-37 con la de IL-1β, IL-18Rα e IL-1R8 en muestras de PBMC de controles (A, C y E) y pacientes (B, D y F).

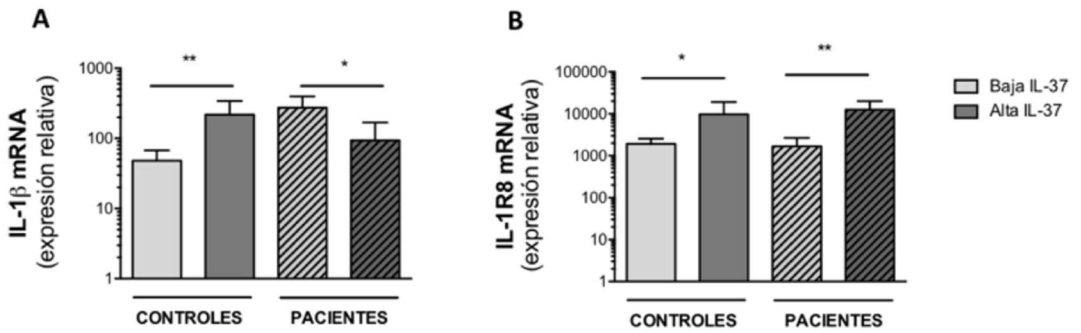


Figura 3: Análisis de la expresión del ARNm de IL-1β e IL-1R8 en PBMC separados en subgrupos en función de los niveles de expresión de IL-37. Ambos grupos experimentales (controles, n=23 y pacientes con reciente diagnóstico de DM1, n=21) se separaron en dos subgrupos según la expresión de IL-37 en los PBMC: Grupo baja IL-37 (<500 unidades de expresión relativa) y Grupo alta IL-37 (>500 unidades de expresión relativa). Se muestra la cuantificación relativa del ARNm de IL-1β (A) e IL-1R8 (B) respecto al ARNm de RPL19 (control).

Se evaluó también la expresión de IL-33 (citoquina miembro de la familia de IL-1 que se encuentra alterada en diversos procesos inflamatorios) y de IL-1Ra (antagonista de la señalización de IL-1β). No se observaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de IL-33 en las PBMC de los pacientes DM1 respecto de los controles sanos. Sin embargo, del mismo modo a lo observado para IL-37, en el caso de los pacientes DM1 se distinguen claramente 2 subgrupos, uno de mayor y otro de menor expresión de IL-33 (Fig. 4A). Se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión del ARNm de IL-33 respecto a la expresión del ARNm de IL-37 tanto en pacientes como en controles ($r=0,65$, $p<0.01$ y $r=0.91$, $p<0.001$, datos no mostrados). Por otro lado, al analizar la correlación entre la expresión del ARNm de IL-33 y el de IL-1β, la correlación positiva que se observó en el grupo control se perdió en el grupo DM1, al igual de lo ocurrido con IL-37 (Fig.4B y C).

Los niveles de expresión del ARNm de IL-1Ra en las PBMC de los pacientes DM1 resultaron similares a los hallados en los controles sanos, no se observó ninguna relación entre los niveles de expresión del ARNm de IL-1Ra respecto a la expresión del ARNm de IL-37 (datos no mostrados).

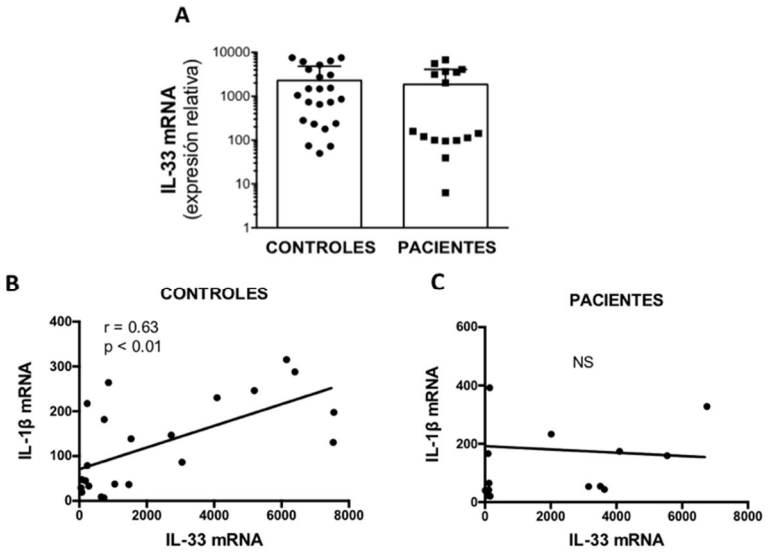


Figura 4: Expresión del ARNm de IL-33 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). (A) Cuantificación relativa del ARNm de IL-33 respecto al ARNm de RPL19 (control) en PBMC aisladas de sangre periférica de controles (n=23) y pacientes con reciente diagnóstico de DM1 (n=21). Se muestra la correlación con la expresión del ARNm de IL-1β en muestras de PBMC de controles (B) y pacientes (C).

Como se describió anteriormente, los niveles de expresión del ARNm de IL-37 en las PBMC correlacionaron positivamente con los correspondientes a IL-1β en individuos sanos, pero no en pacientes con reciente diagnóstico de DM1. Podríamos especular entonces que dicha pérdida de contra-regulación sería más marcada en aquellos individuos que presenten una mayor agresividad autoinmune. Estudiamos entonces la correlación entre la expresión del ARNm de IL-37 en los PBMC del grupo DM1 y parámetros metabólicos e inflamatorios. No observamos correlación entre la expresión del ARNm de IL-37 y la concentración sérica de péptido C, como medida de la capacidad de la masa residual de células β de producir insulina ni de los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), como indicador del estado glucémico de los pacientes. Tampoco, observamos correlación entre la expresión de esta citoquina y los títulos de anticuerpos anti-GAD, como indicador de la activación de la inmunidad humoral contra la célula β.

Para continuar con el estudio del rol de la IL-37 en la fisiopatogenia de la DM1 y evaluar si existe una regulación diferencial de la expresión de IL-37 en las PBMC en los pacientes DM1 respecto de los controles sanos; las células se cultivaron en presencia o ausencia de LPS. En base a los resultados obtenidos con las PBMC frescas se decidió evaluar también la expresión *in vitro* del ARNm de IL-1β.

En condiciones basales, no se observaron diferencias en las expresión del ARNm de IL-37 en las PBMC de los pacientes DM1 respecto de los controles. Sin embargo, la expresión basal *in vitro* de IL-1 β resultó significaticamente mayor en los PBMC aislados de pacientes DM1 ($p<0.05$, Fig. 5A). Estos resultados, concuerdan con la tendencia observada en las muestras frescas de PBMC y evidencian el perfil pro-inflamatorio característico de la patología.

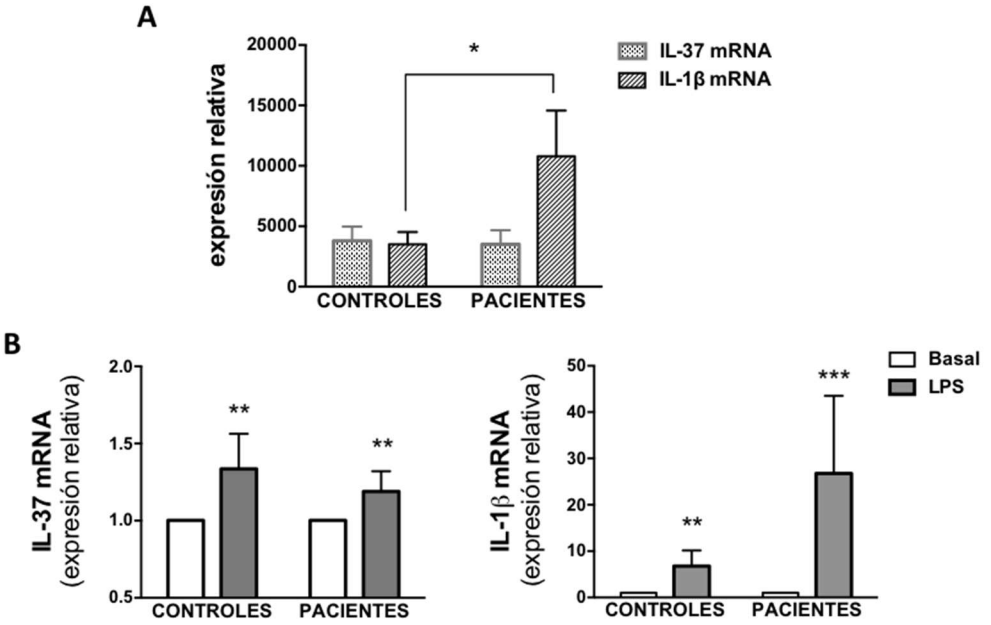


Figura 5: Regulación in vitro de la expresión del ARNm de IL-37 e IL-1β en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC ($1x10^6$) se cultivaron en ausencia (Basal) o presencia de anti-CD3 (aCD3, 1 μg/mL) o LPS (1 μg/mL), luego de 6 h se aisló el ARNm y se evaluó la expresión de IL-37 e IL-1β respecto a RPL19 mediante RT-qPCR. (A) Expresión en condiciones basales en muestras de controles (n=16) y pacientes DM1 (n=16). (B) Efecto del estímulo con LPS en muestras de controles (n=16) y pacientes DM1 (n=16). Los datos se expresan como media ± SEM; (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

En la fracción de PBMC encontramos diversas células inmunes: monocitos, linfocitos (linfocitos T, linfocitos B y células NK) y células dendríticas. Se sabe que el LPS, un lipopolisacárido producido por bacterias gramnegativas, a través de la señalización TLR4, activa principalmente las células inmunitarias innatas como los monocitos y macrófagos y también en menor medida las células de la rama adaptativa como linfocitos T y B.

El tratamiento de las PBMC con LPS incrementó de forma similar la expresión de IL-37 tanto en pacientes como en controles (Fig. 5B). Asimismo, la expresión del ARNm de IL-1β aumentó ante el estímulo de LPS en ambos grupos, observándose una mayor magnitud en los pacientes DM1, la cual no alcanzó significancia estadística debido a la variabilidad de los datos (Fig. 5B).

CONCLUSIONES

En conjunto, estos resultados sugieren que existe una incapacidad, por parte de las PBMC de pacientes con DM1, de responder a la activación pro-inflamatoria mediante el aumento en la transcripción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-37 e IL-33.

Sin embargo, en la población estudiada, no hemos podido establecer correlación alguna entre los niveles de IL-37 y los parámetros metabólicos e inflamatorios estudiados que permitan utilizar la determinación de los niveles de expresión de esta citoquina como marcador de la agresividad del proceso autoinmune en los pacientes con reciente diagnóstico de DM1.

REFERENCIAS

1. Castro CN, *et al* (2010) Disease-modifying immunotherapy for the management of autoimmune diabetes. *Neuroimmunomodulation* 17:173-6.
2. Castro CN, *et al* (2014) Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 177(1):149-60.
3. Nold MF *et al* (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* 11(11):1014-22.
4. McNamee EN *et al* (2011). Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(40):16711-6.
5. Sakai N *et al* (2012) Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol* 27:1609-1616.
6. Ballak DB *et al* (2014) IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun* 5:4711.
7. Ye L *et al* (2014) IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *J. Transl. Med.* 12:69.
8. Cavalli G *et al* (2017) Interleukin 37 reverses the metabolic cost of inflammation, increases oxidative respiration, and improves exercise tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(9):2313-8.
9. Bufler P *et al* (2004) Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *Biochem J* 381:503-510.
10. Zhao PW *et al* (2014) Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF-α, IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS ONE* 9(5): e95346.
11. Li Y *et al* (2014) Increased expression of IL-37 in patients with Graves' disease and its contribution to suppression of proinflammatory cytokines production in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE* 9(9): e107183.
12. Allam G *et al* (2016) Association of IL-37 gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis in Saudi subjects. *Microbiol Immunol* 60(11):778-786.
13. Tan H *et al* (2016) Genetic analysis of innate immunity in Behcet's disease identifies an association with IL-37 and IL-18RAP. *Sci Rep.* 6:35802.
14. Pei B *et al* (2013) Associations of the IL-1F7 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Int J Immunogenet.* 40(3):199-203.
15. Pan F *et al* (2010) Association of IL-1F7 gene with susceptibility to human leukocyte antigen-B27 positive ankylosing spondylitis in Han Chinese population. *Clin Chim Acta.* 411(1-2):124-6
16. Rahman P, *et al* (2006) Association between the interleukin-1 family gene cluster and psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 54(7):2321-5.

ABSTRACT

Type 1A diabetes mellitus (DM1) is characterized by autoimmune destruction of pancreatic β-cells, leading to loss of insulin secretion and glucose homeostasis. In many cases, the administration of exogenous insulin is not enough to achieve the strict glycemic control necessary to avoid the development of long-term complications. The cytokine interleukin 37 (IL-37) has aroused interest as an important inhibitor of innate immunity. Preclinical studies have shown that its over-expression has beneficial anti-inflammatory effects in murine models of autoimmune colitis and arthritis. *In vitro* studies showed that TLR ligands and pro-inflammatory cytokines such as IL-1β induce IL-37 production in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). It was reported that IL-37 is over-expressed in PBMC from patients with Lupus. In patients with Graves' disease, elevated levels of IL-37 were associated with increased disease activity. Based on this background, our main objective was to evaluate the expression of IL-37 in PBMC from patients with a recent diagnosis of DM1 and to analyze its correlation with inflammatory and metabolic indicators. We analyzed the gene expression of IL-37, the subunits of its functional receptor and other cytokines of the IL-1 family in PBMC isolated from 21 patients with a recent diagnosis of DM1 (Hospital Nacional Prof. A. Posadas, Servicio de Nutrición y Diabetes Infantil) and 23 healthy controls of the same age range. The results suggest that the PBMC from patients with DM1 fail to increase the expression of anti-inflammatory cytokines such as IL-37 and IL-33 in response to pro-inflammatory activation. However, we have not been able to establish any correlation between IL-37 levels in PBMC and the metabolic or inflammatory parameters analyzed. Consequently, in the population studied, we could not validate the determination of this cytokine as a biomarker of the autoimmune process aggressiveness in patients with a recent diagnosis of DM1.

INFECCIÓN POR DENGUE

Patricia Baré, Graciela Carballo, Sonia Espíndola, Natalia Aloisi,
María Marta E de Bracco, Roberto Chuit

Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos y causada por un flavivirus, que constituye uno de los problemas más importantes de salud pública en países tropicales y endémicos. Existen cuatro serotipos de virus de dengue (DENV) (DENV-1 al DENV-4) que se encuentran agrupados dentro del género Flavivirus. La enfermedad tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas. A pesar de que las formas febriles pueden tener un curso benigno, la enfermedad por dengue puede aumentar su severidad y transformarse en dengue grave con manifestaciones hemorrágicas, extravasación grave de plasma y compromiso de órganos. Resulta difícil determinar con anticipación la progresión de la enfermedad, lo que genera una gran preocupación, pues el tratamiento apropiado en tiempo y forma podría evitar que se desarrollen condiciones clínicas más graves.

Niveles de citoquinas y su asociación con la clínica:

Las citoquinas son pequeñas moléculas secretadas por distintas células que intervienen en los procesos inmunológicos y actúan como mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios, en respuesta a estímulos específicos.

Diversos trabajos demuestran la existencia de perfiles inmunológicos “protectores” y otros “patológicos” en los individuos, que predispondrán a una enfermedad más o menos severa frente a la infección (Friberg H, et al. 2018; Hatch S, et al. 2011). En algunas publicaciones ha sido reportado que la predisposición genética a una alta producción de TNF-α y una baja producción de IL-10 puede aumentar la susceptibilidad al dengue hemorrágico durante una infección (Pérez AB et al). Por otro lado, se encontraron altos niveles de IL-6 producida por células mononucleares en el 100% de los sujetos que posteriormente desarrollaron una infección sintomática por dengue, frente al 59% de los sujetos que tenían una infección subclínica. Asimismo, la secreción de IL-12, IL-2R, MIP-1α, RANTES, GM-CSF y TNFα demostró niveles significativamente menores en sujetos con infección sintomática (Friberg H, et al. 2018).

El endotelio juega un papel fundamental en la fisiopatología de la infección por dengue (Vervaeke P, at al 2014). La activación del endotelio por IL-6, IL-8 y TNFα se han descrito previamente (Inyoo S, et al. 2017). La activación del sistema endotelial no solo contribuye al sangrado sino también al daño hepático, lo que lleva a la hepatitis que complica el dengue (Samanta J, et al. 2015).

A pesar de que existen numerosos trabajos que describen niveles aumentados de TNF-α, interferón γ (IFN-γ), IL-10 e IL-6 en casos más severos (Nguyen et al. 2004), existe aún bastante controversia y algunos trabajos no reportan tal asociación (Hernández de la Cruz S et al, 2016). La asociación entre severidad y aumento de citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias deja traslucir la naturaleza compleja de la patogenia de esta enfermedad, y su medición constituye una opción interesante para encontrar un marcador predictor de severidad.

La transmisión sostenida de DENV observada en Buenos Aires, CABA, Córdoba, Misiones, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Salta, Santa Fe y Santiago de Estero justifican el estudio de estas infecciones y el esfuerzo por mejorar el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. El estudio de los mecanismos que puedan desencadenar una mayor severidad en nuestra población cobra importancia en nuestro particular contexto epidemiológico.

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

Mediante el análisis retrospectivo sobre 3000 muestras del año 2016 de una zona altamente endémica para Arbovirus, contribuimos a la optimización para la realización de un diagnóstico rápido y certero de la infección por Dengue. Evaluamos la presencia de infecciones secundarias y su impacto en el diagnóstico. Analizamos la utilidad de estudios adicionales que caracterizaran la clínica y que pudieran constituir señales tempranas de severidad de la enfermedad.

Objetivos Específicos:

Relacionados con el diagnóstico de las infecciones:

1. Evaluar distintas técnicas de diagnóstico rápido y técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA) disponibles en el mercado.
2. Poner a punto técnica de PCR tradicional y seleccionar dentro de las existentes en el mercado, la técnica más adecuada de real time PCR para detección y confirmación del patógeno.

Relacionados con la búsqueda de marcadores pronósticos:

- Medir niveles de citoquinas plasmáticas: TNFalfa, IL6, IL10. Asociarlos con la severidad de la enfermedad que haya presentado el paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto es un estudio exploratorio retrospectivo que se basó en el análisis de resultados sobre muestras que se seleccionaron al azar de entre las 3000 muestras de sueros remitidas a nuestro laboratorio mediante una colaboración establecida con el laboratorio CEBAC, Posadas, Misiones.

Las mismas fueron colectadas durante el brote de dengue del año 2016. Los pacientes concurrieron al laboratorio con sintomatología y sospecha de infección por dengue. Todas las muestras han sido testeadas por un método rápido (SD Bioline Dengue Dúo) obteniendo resultados positivos y negativos para antígeno NS1, anticuerpos de tipo IgG e IgM.

Consentimiento informado: Dada la aclaración de la Guía para Investigaciones en Salud Humana, Ministerio de Salud de la Nación, 16 de Nov 2010, las muestras de archivo quedan exentas de la firma de un consentimiento informado. En todos los casos se preservó la confidencialidad de los datos y el anonimato de las muestras en acuerdo a lo establecido por normas nacionales e internacionales.

Criterios de inclusión: Las muestras de plasma o suero cumplieron con los siguientes requisitos:

- Haber sido conservadas y encontrarse en buenas condiciones (a -20ºC o -70ºC).
- Tener datos de laboratorio y de clínica.

Pasos a seguir en el estudio de las muestras:

1. Diagnóstico por ELISA:

Se utilizaron los ensayos DIA.PRO DENV IgM e IgG ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ambas pruebas, IgM e IgG, las microplacas están recubiertas con antígeno inmunodominante NS1 DENV altamente purificado obtenido de 4 genotipos. Para la detección de IgM e IgG, los resultados se calcularon a partir del valor medio de DO450 nm del Control Negativo (NC) mediante un valor de corte (CO) determinado con la siguiente fórmula: Cut-Off = NC + 0.250. Para la detección de IgM, los resultados se expresaron como relaciones de señal a corte (S/CO). Las muestras se consideraron positivas si la proporción de IgM era >1,1, equívocas si la proporción estaba entre 0,9 y 1,1 y negativas si la proporción era <0,9. Las zonas grises se definieron como la relación S/CO de 0,9-1,1. Las muestras que presentaban un valor de DO450 nm superior al valor de CO se consideraron positivas para IgG anti-virus del dengue. Los títulos de IgG se informaron semicuantitativamente. Las relaciones S/CO se convierten a arbU/ml a través de una curva estándar que proporciona una semicuantificación del contenido de IgG en la muestra.

2. Presencia del genoma viral por PCR a tiempo real y PCR *in house*:

El ARN se extrajo utilizando el minikit de ARN QIAmp (QIAgen, CA, EE. UU.) siguiendo los procedimientos del fabricante. La técnica se basa en la separación del genoma viral por columnas de afinidad.

PCR real time comercial: la amplificación de ARN para DENV se realizaron con el RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics, Hamburgo, Alemania). El ensayo incluye un control interno para identificar una posible inhibición de RT-PCR y confirmar la integridad de los reactivos del kit. El kit utiliza sondas marcadas con fluoróforo FAM que permiten la detección paralela de ARN específico de DENV y el control interno en los canales de detección correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real. Los cebadores y las sondas del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 2.0 se basan en las alineaciones de secuencias actuales (2010) de los cuatro subtipos del virus del dengue (1 a 4), lo que permite la detección, pero no la diferenciación entre esos subtipos.

Retrotranscripción y Amplificación del genoma por PCR convencional : La retrotranscripción se realizó a partir de 10 ul de RNA con 200 U de transcriptasa reversa M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega) y el primer externo antisense (D2) a utilizar en la PCR.

Para la detección de DENV en sueros se puso a punto una PCR heminested utilizando primers o cebadores específicos correspondientes a la región de la unión entre la cápside y genes pre-membrana que han demostrado alta sensibilidad (C-prM). A partir de 5 ul de cDNA se amplificó el fragmento con los cebadores modificados por Chien et al, 2006.

3. Medición de niveles de citoquinas en plasmas/sueros.

Las concentraciones de TNF-α (rango de la curva estándar: 0-500 pg/mL), de IL-6 (rango de la curva estándar: 0-300 pg/mL) y de IL-10 (rango de 0 – 500 pg/ml) se determinaron utilizando reactivos comerciales basados en enzimoinmunensayos, ELISA, de BD-Biosciences siguiendo estrictamente las instrucciones de los fabrican. Considerando la dosis mínima detectable de cada citoquina y la reactividad cruzada con otras citoquinas en nuestro sistema, el límite de detección se determinó en 5 pg/ml. Todos los valores entre 0 y 5 se consideraron como 5 pg/ml para fines de análisis estadístico. Para el análisis de datos se utilizaron la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de Chi-cuadrado. En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el asesoramiento del Dr. Chuit y su equipo del Instituto de Investigaciones Epidemiológicas de la Academia Nacional de Medicina. Los resultados se expresan con medias y desviaciones standard o medianas y rangos dependiendo de la distribución de los mismos. Para el análisis y gráficos se utilizó el programa GraphPad 9.0(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Las comparaciones entre los distintos parámetros se realizaron mediante test U de Mann Whitney o t de Student según presentaran o no distribución normal de sus resultados. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para analizar variables categóricas. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman según la distribución de las variables. Los intervalos de confianza se fijaron al 95% (IC95). Se calculó el coeficiente kappa (k) para medir el grado de concordancia no aleatoria entre variables categóricas. La concordancia se considera moderada si kappa está entre 0,41 y 0,60, alta si kappa está entre 0,60 y 0,80 y concordancia casi perfecta si es superior a 0,80. En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR DENGUE

Nuestro primer objetivo consistió en caracterizar la eficiencia de los reactivos de diagnóstico que fueron utilizados durante el brote del 2016 para evaluar la capacidad de distinguir y diagnosticar infecciones agudas por dengue.

Por otro lado, explorar la prevalencia de infecciones secundarias en el contexto epidemiológico de la ciudad de Posadas y analizar el impacto de estas en la performance de los estudios de diagnóstico. Las infecciones secundarias o reinfecciones ocurren debido a la falta de protección cruzada frente a los distintos serotipos de dengue y su presencia se asocia con mayor frecuencia a cuadros de mayor severidad.

Se emplearon técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA) para confirmar los diagnósticos que habían sido realizados por el método rápido SD Bioline Dengue Duo. Este es un método de elección en muchos laboratorios de diagnóstico y de amplia utilidad durante brotes por su rapidez y fácil utilización. La prueba de detección rápida SD BIOLINE Dengue Duo es un inmunoensayo cromatográfico in vitro de un solo paso diseñado para detectar el antígeno NS1 (AgNS1) del virus del dengue y los anticuerpos IgG y IgM contra el virus del dengue en suero, plasma o sangre completa humanos. La aparición de cualquier línea de prueba, aunque sea débil, debe interpretarse como positiva. Se prevé que el AgNS1 se detecte 1 día después del inicio de la fiebre y que persista hasta 9 días en la primoinfección y la infección secundaria por dengue. La primoinfección por dengue se caracteriza por la presencia de IgM detectable entre 3 y 5 días después del inicio de la infección. La infección secundaria por dengue se caracteriza por la elevación de los anticuerpos IgG específicos entre 1 y 2 días después del inicio de la infección y, en la mayoría de casos, suele ir acompañada de una elevación de la IgM 20 días después del inicio de los síntomas.

RESULTADOS

Entre las muestras que resultaron positivas para dengue mediante el kit rápido, 1969 (65,9 %) fueron positivas para alguno de los marcadores del ensayo inmunocromatográfico, AgNS1 y/o anti-DENV IgM y/o IgG. Entre 1800 muestras evaluables, se analizaron 315 muestras seleccionadas al azar con una técnica de ELISA para IgM e IgG (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes s.r.l., Milán, Italia). Asimismo, se analizó la presencia de genoma viral mediante una técnica de amplificación por PCR. Comparamos los resultados del ELISA y la PCR con los de la técnica rápida (SD BIOLINE Duo) (**Tabla 1a**).

El 71,11 % (224 de 315) de las muestras fueron clasificadas como positivas por SD BIOLINE Dengue Duo, y 207 (92,4 %) tenían marcadores de infección aguda (Ag NS1+, Ag NS1 e IgM+, o IgM+ sola). La proporción de muestras que presentaron AgNS1+ por la técnica rápida (183 muestras) no fue significativamente diferente a la proporción de resultados positivos encontrados usando la técnica de PCR, 177 de 315, ($p = 0.68$). Esto indicaría que la capacidad de la técnica rápida y la PCR para detectar viremia en la infección fue similar.

La concordancia (kappa) y la correlación (r) entre las plataformas de detección de antígenos, viremia y detección de anticuerpos se muestran en la **Tabla 1b**. El índice Kappa y la correlación entre la técnica rápida y la PCR-DENV mostraron una alta concordancia con resultados similares en el 83 % de los casos (261 casos de 315) (k=0,65; IC95%: 0,565 a 0,735; r=0,65, IC95%= 0,5820 a 0,7101). Sin embargo, la proporción de muestras positivas encontradas con SD BIOLINE Dengue Duo IgM e IgG fue significativamente diferente a la de la técnica de ELISA, Dia.Pro ELISA IgM e IgG ($p< 0,0001$), mostrando una menor sensibilidad de la prueba rápida para anticuerpos IgM o IgG. El índice Kappa y de correlación r fueron moderados para IgM y bajos para IgG entre SD BIOLINE y el ELISA de Dia.Pro (**Tabla 1b**).

Tabla 1

a. Resultados globales obtenidos con las distintas metodologías

N=315	**SD BIOLINE Duo (técnica rápida)**			**Dia.Pro ELISA**		**PCR-DENV**
Resultados	NS1 Ag	IgM	IgG	IgM	IgG	RNA
POS	183	62	33	122	166	177
NEG	132	253	281	193	149	138
% positividad	**58.1**	**19.7**	**10.5**	**38.73**	**52.7**	**56.2**

b. Concordancia (k) y correlación (r) entre las técnicas

		PCR DENV	**IgM DIAPRO Elisa**	**IgG DIAPRO Elisa**
SD Bioline DUO técnica rápida	**NS1 Ag**	0.65 (0.65)		
	IgM		0.47 (0.52)	
	IgG			0.18 (0.31)

Notas:

1) Todas las correlaciones mostraron valores de $p < 0.0001$;
2) Concordancia Kappa (k): pobre, < 0.41; moderada 0.41 – 0.60; alta, 0.60 - 0.80

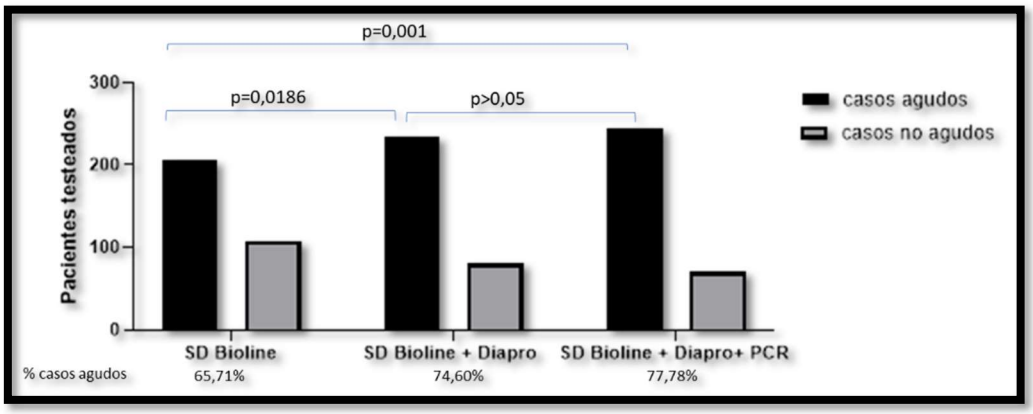
Diagnóstico de casos agudos durante el brote:

El diagnóstico de la infección durante un brote constituye un desafío para los laboratorios y se espera que los resultados se completen con la mayor rapidez y precisión posibles.

A continuación, intentamos probar si la técnica rápida había sido lo suficientemente sensible para resolver casos agudos de DENV durante el brote de 2016 y comparamos los resultados al realizar la prueba sola y agregando la detección por PCR y por ELISA de anticuerpos de tipo IgM.

Como se muestra en la figura 1, la técnica rápida fue capaz de resolver casos agudos en 207 de las 315 muestras. La detección de casos agudos aumentó cuando se combinó la técnica rápida SD Bioline con el ELISA-IgM (235 casos agudos) y aún más cuando se agregó al algoritmo la detección por PCR, 245 de 315. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar técnica rápida + ELISA-IgM o técnica rápida + ELISA-IgM + PCR y esto está de acuerdo con nuestros resultados anteriores que muestran que la detección de NS1-Ag de la técnica rápida SD Bioline Dúo tiene una buena correlación y sensibilidad similar a la PCR.

Figura 1



Observaciones de la figura 1:

La detección de anticuerpos IgM por ELISA mejoró la capacidad de diagnosticar infecciones agudas cuando se adicionó a la detección de AgNS1 de a técnica rápida. La PCR también mejora el número de casos agudos detectados (78%). Sin embargo, teniendo en cuenta el número de muestras analizadas, no se observan diferencias significativas cuando se compara con AgNS1+IgM solos.

FRECUENCIA DE INFECCIONES SECUNDARIAS

Debido a que la frecuencia de infecciones secundarias en una región podría anticipar la frecuencia de casos graves durante un brote futuro, pero también podría definir la posibilidad de vacunar a los individuos de esa región, nos enfocamos en distinguir las infecciones primarias de las secundarias e investigar la frecuencia de infecciones secundarias en nuestra población.

Definimos los perfiles serológicos de DENV durante el brote del 2016. La **Tabla 2** muestra el número de individuos en tardía (33,7%), aquellos que presentan viremia junto con la fase de viremia (26,7%) (solo AgNS1+ o PCR DENV+), en la fase inmunológica aguda (5%) (AgNS1 y/o PCR+ y anticuerpos IgM+), en la fase inmunológica anticuerpos de tipo IgG que forman parte de las infecciones secundarias (11,74%), los casos con infección pasada (7%), y aquellos sin signos de infección presente o pasada por DENV (15,9%).

Perfiles serológicos de DENV					
	NS1 Ag	PCR-DENV	IgM	IgG	N
Fase virémica	+	-	-	-	7
	-	+	-	-	8
	+	+	-	-	69
Fase inmunológica aguda	+	-	+	-	3
	-	+	+	-	2
	+	+	+	-	7
	-	-	+	-	4
Fase inmunológica tardía	+	-	+	+	20
	-	+	+	+	12
	+	+	+	+	42
	-	-	+	+	32
Viremia+IgG (infecciones secundarias)	+	-	-	+	0
	-	+	-	+	2
	+	+	-	+	35
Infección pasada	-	-	-	+	22
Ausencia de infección	-	-	-	-	50

Mediante el análisis de estos resultados, clasificamos las infecciones en primarias y secundarias según la presencia del tipo de anticuerpos y viremia. Considerando los diferentes perfiles encontrados, se consideraron como potenciales infecciones secundarias aquellas que presentaron viremia (AgNS1 o PCR DENV) junto con anticuerpos IgG positivos y, dependiendo de la tasa de anticuerpos IgM/IgG, las del grupo de "fase inmunológica tardía".

Se calcularon las tasas de anticuerpos IgM/IgG para clasificar el tipo de infección, primaria o secundaria, en el grupo de en "fase inmunológica tardía". Aquellas muestras con una tasa IgM/IgG <1,7 se clasificaron como infecciones secundarias y las de IgM/IgG >1,7 correspondieron a infecciones primarias. Además, se evaluaron los títulos de anticuerpos IgG como estudio confirmatorio para ratificar el estado de infección primaria o secundaria de las muestras ya que un título alto de anticuerpos de tipo IgG, durante la etapa aguda se asocia a la presencia de una infección secundaria.

Dentro de este grupo, solo una muestra entre las 106 presentó una tasa de IgM/IgG > 1,7 y se consideró que tenía una infección primaria. Los títulos de anticuerpos de tipo IgG altos observados en el grupo confirmaron la presencia de infecciones secundarias. Es importante tener en cuenta que las muestras se obtuvieron durante la etapa aguda de la infección, coincidiendo con los síntomas clínicos.

El número total de infecciones secundarias ascendió a 142 de 315 (45%). Si tenemos en cuenta solo las muestras con infección confirmada por DENV (243 de 315) y omitiendo aquellas muestras que no indicaron estar relacionadas con la infección por DENV, la proporción de infecciones secundarias representó el **58,44%,** 142 de 243.

Impacto de las infecciones secundarias en la prueba de diagnóstico SD BIOLINE Dengue DUO:

Se encontró una frecuencia significativamente mayor de resultados discordantes entre AgNS1 de la técnica rápida y la PCR entre las muestras que presentaban infecciones secundarias (p=0,0043) (OR: 2,4; IC 95%=1,327 a 4,463). La probabilidad de encontrar un resultado discordante es 2,4 veces mayor en este grupo. Además, la concordancia entre la detección de AgNS1 y la detección por PCR fue mayor cuando se excluyeron del análisis los individuos con infecciones secundarias (k= 0,65 versus k=0,769). Esto indicaría que el rendimiento de la prueba rápida podría verse significativamente afectado por la presencia de títulos elevados de IgG por infecciones secundarias.

Observaciones:

1. Con la combinación de las 3 metodologías, método rápido de detección de antígeno NS1, PCR-DENV y anticuerpos anti-IgM, pudimos resolver 99% de los casos agudos que son los importantes para la toma de decisiones clínicas.
2. La frecuencia de infecciones secundarias que asciende al 45% de las muestras estudiadas confirma la alta incidencia de infección por DENV en la región y predice la susceptibilidad de los individuos ante futuros brotes.
3. Es importante considerar que, a la vista de nuestros resultados, los marcadores de infección aguda pierden eficiencia en aquellas muestras que presentan infecciones secundarias.

CITOQUINAS EN LA INFECCIÓN POR DENGUE

RESULTADOS

Para medir la concentración en plasma de las citoquinas mencionadas se utilizaron kits de ELISA y se construyeron curvas con un estándar de concentración para cada una de ellas, como se describe en materiales y métodos.

Figura 2: Concentración de citoquinas en plasmas/ sueros, expresadas en log (pg/ml).

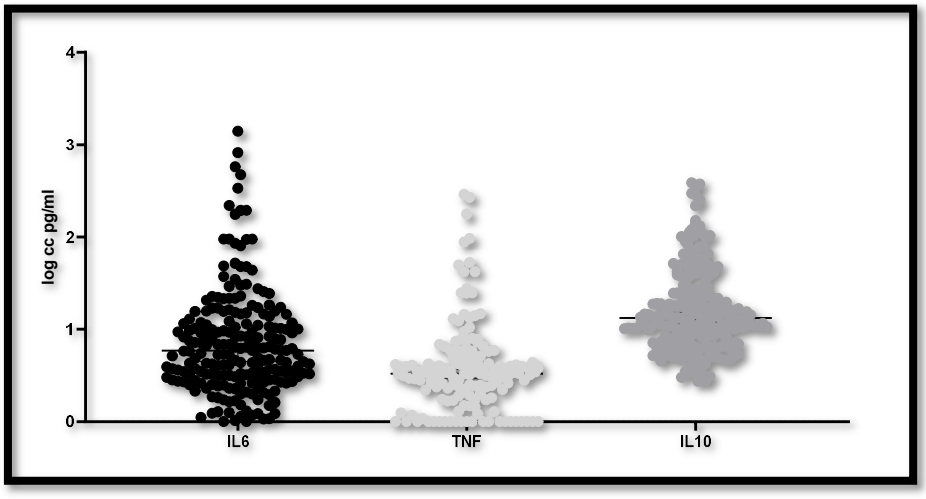


Tabla 3: Estadística descriptiva de concentraciones de las citoquinas analizadas en el total de muestras.

PACIENTES DENGUE	IL6	TNF	IL10
N	210	153	232
Mediana	5,86	5	12,93
Media	32,5	13,07	31,89
SD	125,8	35,87	56,63
SE	8,682	2,9	3,718

DONANTES NORMALES	IL6	TNF	IL10
N	29	24	49
Mediana	5,00	5,00	6,78
Media	6,32	5,08	7,93
SD	2,959	0,297	3,672
SE	0,550	0,061	0,525

Se observaron concentraciones mayores de IL 6 ($p=0.03$), de TNF ($p=0.04$) y de IL 10 ($p<0.0001$) en los plasmas de individuos con dengue comparados con los plasmas de los donantes normales. Este análisis se realizó tomando el valor de 5 pg/ml como el límite de detección de la reacción y considerando sobre este valor a todas aquellas concentraciones menores al mismo.

Asociación de niveles de citoquinas y severidad clínica:

- **Grupo de individuos con valores elevados para IL6 (>40 pg/ml) presentaron:**

1. Hematocrito significativamente disminuido $p=0.04$.
2. Recuento de blancos significativamente superiores $p<0.0001$.

El resto de los parámetros clínicos no mostraron diferencias con el grupo con valores normales de IL6.

- **Grupo de individuos con valores elevados para TNF (>40 pg/ml) presentaron:**

Parámetros clínicos sin diferencias significativas con el grupo que presenta valores normales de TNF.

- **Grupo de individuos con valores elevados para IL10 (>40 pg/ml) presentaron:**

Recuentos de plaquetas menores que aquellos con valores bajos de IL10 ($p=0.05$).

Los valores de IL10 fueron significativamente mayores en individuos cuyos recuentos de plaquetas fueron menores a 145000 /mm^3 ($p=0.04$).

Los individuos con enzimas hepáticas elevadas AST o ALT, valor normal X2, mostraron una tendencia de IL6 e IL10 más elevadas. TNF no mostró valores altos en este grupo.

CONCLUSIONES

Los laboratorios de diagnóstico se enfrentan a varios desafíos para la correcta detección de enfermedades arbovirales que incluyen una presentación clínica inespecífica.

Se evaluó el desempeño de la prueba de diagnóstico rápido (SD Bioline Dengue Dúo) utilizada durante el brote en Posadas comparando la posibilidad de resolver los casos agudos al agregar DENV-PCR e IgM-ELISA. Además, analizamos la frecuencia de "posibles infecciones secundarias" y su impacto en la realización de pruebas diagnósticas, en el marco de un contexto epidemiológico real en Misiones, Argentina. Finalmente se midieron los niveles de citoquinas en circulación para evaluar su asociación con la severidad del cuadro clínico.

Observación 1: Nuestros resultados muestran que la plataforma de detección de antígeno NS1 de la prueba rápida utilizada en el laboratorio local durante el brote de 2016 tuvo una alta concordancia y una buena correlación con la PCR de DENV realizada. Se confirmaron numerosos casos agudos de DENV en casi el 80% de los pacientes evaluados. A pesar de la buena especificidad y sensibilidad de su plataforma de detección de antígeno, la detección de anticuerpos IgM e IgG del SD Bioline Dengue DUO no funcionó bien en nuestro contexto, mostrando una sensibilidad muy limitada en comparación con la técnica de ELISA y particularmente, para la detección de anticuerpos IgG. Nuestros resultados concuerdan con informes anteriores (Vickers et al, 2015; Hunsperger EA et al, 2016; Blessman et al, 2020).

Conclusión 1: En un futuro brote de emergencia, en una región donde el aislamiento viral y los métodos moleculares no son posibles (o costosos de realizar), la prueba SD Bioline Dengue DUO podría usarse, si es posible, en combinación con IgM, sin una pérdida significativa de diagnóstico casos agudos.

Observación 2: Este estudio proporciona evidencia de una alta incidencia de infección por DENV en el área con alta proporción de infecciones secundarias en la población de Misiones.

Conclusión 2: Por qué es importante conocer la frecuencia de infección secundaria en una región?

El dengue grave podría explicarse por diferentes teorías. Entre ellos, la actividad potenciadora de la enfermedad de los anticuerpos de reactividad cruzada, provocados por una infección previa con virus heterotípicos (ADE=aumento dependiente de anticuerpos, por sus siglas en inglés). La historia inmunológica es importante para comprender el riesgo de enfermedad subsiguiente y la protección en la infección por el virus del dengue (Soo et al, 2016, Halstead S, 2019).

Observación 3: Encontramos un impacto negativo de la presencia de títulos de IgG de infecciones secundarias al detectar casos agudos de DENV.

Los resultados discordantes entre el antígeno NS1 de la técnica rápida y la PCR de DENV fueron 2,4 veces más frecuentes en el grupo de muestras que presentaban infecciones secundarias. Sin embargo, no se puede dejar de lado que la discrepancia observada de los resultados también podría sugerir una variación individual o diferencias en el momento de estos marcadores en el suero del paciente.

En entornos donde la infección por DENV es altamente endémica, la detección de casos agudos de DENV podría no estimarse correctamente mediante las técnicas rápidas. Una de las razones podría ser la existencia de anticuerpos neutralizantes anti-NS1.

Conclusión 3: El efecto de las infecciones secundarias en las pruebas de diagnóstico podría tener consecuencias en el diagnóstico de DENV pero también podría afectar el diagnóstico de otras infecciones por arbovirus (por ejemplo, zika) (Lindsey et al, 2017). En el caso de un brote de enfermedad arboviral diferente en la misma región, los resultados obtenidos podrían ser difíciles de interpretar.

Observación 4: Los individuos con mayor producción de citoquinas presentaron parámetros clínicos fuera de los rangos normales que pueden asociarse a un peor cuadro clínico (hematocrito, recuentos de plaquetas y recuento de glóbulos blancos).

Conclusión 4: Se considera que para realizar este análisis de manera correcta y que la medición pueda contribuir al pronóstico del paciente, deberíamos tomar en cuenta los valores de cada citoquina según la fase de infección en la que se encuentra el paciente, realizando mediciones secuenciales en el tiempo, acompañando los estudios clínicos de rutina, que permitan evaluar con mayor certeza el estado clínico y anticipar una posible progresión a mayor severidad.

REFERENCIAS

- Blessmann J, Winkelmann Y, Keoviengkhone L, Sopraseuth V, Kann S, Hansen J, El Halas H, Emmerich P, Schmidt-Chanasit J, Schmitz H, Mika A, Deschermeier C. Assessment of diagnostic and analytic performance of the SD Bioline Dengue Duo test for dengue virus (DENV) infections in an endemic area (Savannakhet province, Lao People's Democratic Republic). PLoS One. 2020 Mar 17;15(3):e0230337. doi: 10.1371/journal.pone.0230337. PMID: 32182271; PMCID: PMC7077838.
- Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1295-304. doi: 10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006. PMID: 16597854; PMCID: PMC1448645.
- Cruz Hernández SI, Puerta-Guardo HN, Flores Aguilar H, González Mateos S, López Martinez I, Ortiz-Navarrete V, Ludert JE, Angel RM. Primary dengue virus infections induce differential cytokine production in Mexican patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016 Mar;111(3):161-7. doi: 10.1590/0074-02760150359. PMID: 27008374; PMCID: PMC4804498.
- Friberg H, Beaumier CM, Park S, Pazoles P, Endy TP, Mathew A, Currier JR, Jarman RG, Anderson KB, Hatch S, Thomas SJ, Rothman AL. Protective versus pathologic pre-exposure cytokine profiles in dengue virus infection. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Dec 17;12(12):e0006975. doi: 10.1371/journal.pntd.0006975. PMID: 30557313; PMCID: PMC6312351.
- Halstead S. Recent advances in understanding dengue. F1000Res. 2019 Jul 31;8:F1000 Faculty Rev-1279. doi: 10.12688/f1000research.19197.1. PMID: 31448083; PMCID: PMC6676504.
- Hatch S, Endy TP, Thomas S, Mathew A, Potts J, Pazoles P, Libraty DH, Gibbons R, Rothman AL. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. J Infect Dis. 2011 May 1;203(9):1282-91. doi: 10.1093/infdis/jir012. Epub 2011 Feb 18. PMID: 21335561; PMCID: PMC3069729.

- Hunsperger EA, Sharp TM, Lalita P, Tikomaidraubuta K, Cardoso YR, Naivalu T, Khan AS, Marfel M, Hancock WT, Tomashek KM, Margolis HS. Use of a Rapid Test for Diagnosis of Dengue during Suspected Dengue Outbreaks in Resource-Limited Regions. J Clin Microbiol. 2016 Aug;54(8):2090-5. doi: 10.1128/JCM.00521-16. Epub 2016 May 25. PMID: 27225409; PMCID: PMC4963516.
- Inyoo S, Suttitheptumrong A, Pattanakitsakul SN. Synergistic Effect of TNF-α and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. Jpn J Infect Dis. 2017 Mar 24;70(2):186-191. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.123. Epub 2016 Aug 31. PMID: 27580574
- Lindsey NP, Staples JE, Powell K, Rabe IB, Fischer M, Powers AM, Kosoy OI, Mossel EC, Munoz-Jordan JL, Beltran M, Hancock WT, Toews KE, Ellis EM, Ellis BR, Panella AJ, Basile AJ, Calvert AE, Laven J, Goodman CH, Gould CV, Martin SW, Thomas JD, Villanueva J, Mataia ML, Sciulli R, Gose R, Whelen AC, Hills SL. Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. J Clin Microbiol. 2017 Dec 26;56(1):e01115-17. doi: 10.1128/JCM.01115-17. PMID: 29093104; PMCID: PMC5744200.
- Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. J Infect Dis. 2004 Jan 15;189(2):221-32. doi: 10.1086/380762. Epub 2004 Jan 9. PMID: 14722886.Lin CF et al. 2005
- Pérez AB, García G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera MV, Rodríguez R, Rosario D, Martínez E, Denny T, Guzmán MG. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. J Med Virol. 2004 Jun;73(2):230-4. doi: 10.1002/jmv.20080. PMID: 151227
- Samanta J, Sharma V. Dengue and its effects on liver. World J Clin Cases. 2015 Feb 16;3(2):125-31. doi: 10.12998/wjcc.v3.i2.125. PMID: 25685758; PMCID: PMC4317605
- Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. PLoS One. 2016 May 23;11(5):e0154760. doi: 10.1371/journal.pone.0154760. PMID: 27213782; PMCID: PMC4877104.
- Vervaeke P, Vermeire K, Liekens S. Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. Rev Med Virol. 2015 Jan;25(1):50-67. doi: 10.1002/rmv.1818. Epub 2014 Nov 27. PMID: 25430853
- Vickers IE, Harvey KM, Brown MG, Nelson K, DuCasse MB, Lindo JF. The performance of the SD BIOLINE Dengue DUO® rapid immunochromatographic test kit for the detection of NS1 antigen, IgM and IgG antibodies during a dengue type 1 epidemic in Jamaica. J Biomed Sci. 2015 Jul 16;22(1):55. doi: 10.1186/s12929-015-0164-9. PMID: 26173484; PMCID: PMC4502463.

ABSTRACT

Dengue remains a major public health problem in the Americas despite efforts to prevent epidemics and mitigate their impact. Distinguishing arbovirus infections using clinical symptomatology is challenging because Arboviruses are endemic to the same geographical regions and cause similar symptoms. The disease has a wide spectrum of clinical manifestations.

Through the retrospective analysis of 3,000 samples from the 2016 dengue outbreak in Posadas, Misiones, we contributed to the optimization for a rapid and accurate diagnosis of Dengue infection. We evaluated the presence of secondary infections and their impact on the diagnosis. We also analyzed the utility of cytokine concentration analyses that would constitute early signs of disease severity.

Our results show that the rapid test NS1 antigen detection platform used in the local laboratory had high concordance and good correlation with the DENV PCR performed. In a future emergency outbreak, in a region where viral isolation and molecular methods are not possible (or expensive to perform), the SD Bioline Dengue DUO test could be used, if possible, in combination with IgM, without significant loss diagnostic acute cases. This study also provides evidence of a high incidence of DENV infection in the area with a high proportion of secondary (58%) that may impact the severity of the disease in future arbovirus outbreaks. Likewise, we found a negative effect of IgG antibodies from secondary infections when detecting acute cases of DENV.

Individuals with higher cytokine production had clinical parameters outside the normal ranges that could be associated with a worse clinical progression (hematocrit, platelet counts and white blood cell counts). The measurement of cytokine concentration in blood could contribute to the patient's prognosis, if sequential measurements of the different cytokine levels is made over time, accompanying routine clinical studies, which allow evaluating with greater certainty the clinical status and anticipate possible progression to severity.

ESTABLECIMIENTO DE MARCADORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS EN NIÑOS EN SITUACIÓN DE INSEGURIDAD SOCIOECONÓMICA

Bruno Gabriel Berardino

Laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades Tempranas, Departamento de Química Biológica (QB), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN). Universidad de Buenos Aires (UBA)

ANTECEDENTES

La plasticidad neuronal permite a los mamíferos el continuo aprendizaje de nuevas habilidades, la integración de nuevas experiencias y la formación de memorias que pueden permanecer durante toda la vida del individuo y es fundamental para el correcto desarrollo y supervivencia del organismo. Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la plasticidad tienen bases celulares y moleculares que permiten la adaptación a diferentes contextos ambientales.

Una gran cantidad de evidencias demuestran la existencia de una asociación entre el ambiente de desarrollo y una alta tasa de riesgo de aparición de trastornos psiquiátricos y psicológicos en niños y adolescentes. Sin embargo, un considerable porcentaje de niños que han sido sometidos a experiencias adversas tempranas son resistentes a la presencia de este tipo de sintomatología [1]. Es decir, a la vulnerabilidad que exhiben los primeros frente a la adversidad, estos últimos presentan una resiliencia frente a las mismas condiciones. La naturaleza y cronicidad de las experiencias adversas, la presencia de apoyo psicosocial o la historia familiar de enfermedades psiquiátricas son algunos de los factores que confieren vulnerabilidad o resiliencia. Entre ellos, en los últimos años se ha señalado especialmente a los factores genéticos y epigenéticos [2,3,4]. Recientes evidencias señalan la existencia de variantes en ciertos genes que podrían ser fuente de diferencias individuales en la sensibilidad a las experiencias en períodos tempranos de la vida. La combinación de estas variantes génicas (componente genético) con los cambios en su expresión causados por modificaciones epigenéticas derivados del ambiente al que ha sido expuesto y a las experiencias a las que ha sido sometido el individuo (componente epigenético) generan cambios en la programación del desarrollo del cerebro que pueden resultar en un individuo con un mayor riesgo a psicopatologías o dificultades de desarrollo (vulnerabilidad) o una mayor resistencia (resiliencia) [5,6].

La presencia de ciertas variantes alélicas en el genoma está relacionada con una mayor o menor sensibilidad a las consecuencias de las adversidades. Uno de los casos más estudiados es el del gen *SLC6A4* que codifica al transportador de la serotonina (5-HTT). Se han encontrado dos variantes del gen de 5-HTT, larga (L) y corta (S) que tienen distinta actividad. La variante S tiene una menor actividad y ha sido relacionada con un mayor riesgo a la precipitación de trastornos de ansiedad y depresión debido a una más lenta eliminación de la serotonina intersináptica [7,8]. De forma similar, el gen de la monoamino oxidasa A (MAOA), que degrada la serotonina, se encuentra en al menos dos

variantes con distinta actividad, siendo la variante de menor actividad aquella que presupone un riesgo mayor a la adquisición de psicopatologías [9,10]. El gen *FKBP5*, codifica para un miembro del complejo del receptor de glucocorticoides (GR-NR3C1) y presenta varios polimorfismos. Uno de ellos (rs1360780) codifica una versión de la proteína que reduce la capacidad del complejo GR para translocar al núcleo y de este modo disminuye el mecanismo de retroalimentación negativa para finalizar la respuesta al estrés, por lo que está asociado a incrementar el riesgo [11,12].

Además de sus distintas variantes, la actividad transcripcional de estos genes está regulada por la metilación del DNA en sus regiones regulatorias. Sin embargo, este aspecto no fue abordado en este estudio y queda pendiente como perspectiva a futuro en caso de recibir nuevos financiamientos para el proyecto. En resumen, la variante de estos genes que posea un individuo en su genoma y la subsecuente metilación del DNA de acuerdo con las exposiciones ambientales recibidas dará como resultado una combinación de factores que permitiría evaluar un cierto grado de riesgo potencial a la aparición de trastornos cognitivos y afectivos.

OBJETIVO

El presente proyecto estudió el efecto de portar algunas de las variantes génicas mencionadas (*SLC6A4*, *MAOA* y *FKBP5*) sobre el desarrollo emotivo y cognitivo de niños de una escuela perteneciente a un barrio de nivel socio-económico medio-bajo.

METODOLOGÍA

Desde septiembre hasta diciembre de 2018 se realizó la toma de muestras de saliva en niños y niñas de 6 a 10 años del Colegio "Sagrada Familia", ubicado en un barrio de nivel socioeconómico medio-bajo en la localidad de Billinghurst, partido de General San Martín, Provincia de Buenos Aires. En colaboración con el grupo de la Dra. María Belén Mesurado (CIIPME, CONICET), se confeccionaron y administraron los consentimientos informados a los padres/madres de los niños/as. Se concurrió al establecimiento escolar en cuatro oportunidades en las que se obtuvieron 118 muestras de saliva. Las evaluaciones neuropsicológicas fueron administradas por psicólogos del grupo del CIIPME. Se estudió la teoría de la mente, el control inhibitorio y el desarrollo cognitivo, y, por otro. Se realizó el "*Inequity Game*" para evaluar la aversión a la inequidad, el "*STROOP test*" para evaluar el control inhibitorio cognitivo, el "*Go-NoGo test*" para evaluar el control inhibitorio motor, "*Sally and Anne test*" para evaluar la capacidad de mirar desde la perspectiva del otro, y el "*K-ABIT test*" para evaluar la inteligencia.

Las muestras de saliva fueron colectadas en tubos Falcon de 50 ml por el método del "babeo pasivo" ("*passive drool*"). Se requirieron al menos 5 ml de saliva de cada individuo, que luego fueron congelados a -80 °C hasta su utilización. Las variantes genéticas asociadas al control emocional fueron analizadas a través de técnicas de rutina en el Laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades Tempranas (QB, FCEyN, UBA). A partir de cada muestra de saliva congelada se procedió a extraer el DNA genómico, utilizando el kit *PureLink Genomic DNA* (*Thermo Fisher Scientific*). El DNA fue cuantificado (*Nanodrop*, *Biorad*) y su integridad analizada en un gel de agarosa 0,8%. Se estableció como criterio de pureza una relación 260/280 entre 1,7 y 1,9 para el DNA y que no se observe degradación significativa en la electroforesis. En nuestro laboratorio,

con la aplicación de estas metodologías, se obtienen rendimientos entre 10-25 µg de DNA. Los operadores eran ciegos al origen de cada una de las muestras.

El DNA obtenido se utilizó para la determinación de variantes génicas. Esto es, el análisis de la presencia de alelos en ciertos genes que, como fue descripto más arriba, aumentan el riesgo de presentar desórdenes de comportamiento y cognitivos. El gen *SLC6A4* presenta un polimorfismo en su región regulatoria. Los *primers* utilizados para la PCR son específicos para la identificación de los dos alelos correspondientes a dichos polimorfismos: el corto o S (asociado a una baja expresión) y el largo o L (asociado a una alta expresión). Se generaron dos productos de PCR: uno de 484 y otro de 528 pares de bases, respectivamente. Las variantes del gen *MAOA* tienen diferente número de repeticiones (2R, 3R, 4R y 5R) y, mediante *primers* específicos y posterior PCR, se puede identificar dicho número en una región del gen denominada "repeticiones nucleotídicas variables en tándem" (VNTR). En estos casos, el genotipo fue determinado por PCR y posterior resolución por electroforesis en gel de agarosa 2,5% y visualización de bandas correspondientes a los productos de diferentes tamaños. El polimorfismo de nucleótido único del gen *FKBP5* que confiere riesgo (rs1360780 o TT) puede detectarse con una PCR en tiempo real que utiliza sondas cortas específicas (*Taqman*, *Thermo Fisher Scientific*) para hibridar con cada uno de los tres genotipos posibles (CC, CT y TT). La variante protectiva es CC y la heterocigota, CT. Los resultados de genotipificación del gen *FKBP5* fueron realizados en colaboración con la Dra. Valeria Genoud (QB, FCEyN, UBA).

De las 118 muestras de saliva recolectadas, 96 resultaron en una muestra de DNA con rendimiento, pureza e integridad aceptables para ser analizadas en cuanto a las variantes génicas. En algunas muestras de DNA no pudieron observarse bandas en los geles de agarosa para determinar los genotipos y alelos (los tamaños muéstrales para cada gen se indican en las secciones correspondientes).

RESULTADOS

Las frecuencias de cada genotipo para los genes *SLC6A4*, *MAOA* y *FKBP5* obtenidos en la población de niños/as del Colegio "Sagrada Familia" se muestran en la **Tabla 1** (*SLC6A4*, n = 85; *MAOA*, n = 88; *FKBP5*, n = 88). Las frecuencias alélicas para el gen *SLC6A4*, *MAOA* y *FKBP5* se muestran en la **Tabla 2**, **Tabla 3** y **Tabla 4**, respectivamente.

Tabla 1 | Frecuencias genotípicas para los genes *SLC6A4*, *MAOA* y *FKBP5* en la población en estudio.

Genotipo	*SLC6A4*	*MAOA*	*FKBP5*
Protectivo	0,247	0,477	0,489
Heterocigota	0,471	0,284	0,330
Riesgo	0,282	0,239	0,182

Tabla 2 | Frecuencias alélicas para el gen *SLC6A4* en la población en estudio.

Alelo	*SLC6A4*
L (largo)	0,482
S (corto)	0,518

Tabla 3 | Frecuencias alélicas para el gen *MAOA* en la población en estudio.

Alelo	*MAOA*
5R	0,017
4R	0,597
3R	0,381
2R	0,0057

Tabla 4 | Frecuencias alélicas para el gen *FKBP5* en la población en estudio.

Alelo	*FKBP5*
C	0,653
T	0,347

En primer lugar, se observó que, para los genotipos de riesgo (R) de los genes *SLC6A4* y *FKBP5*, la media muestral del score K-ABIT se encontraba sobre o por debajo del límite inferior del desempeño promedio poblacional de dicho test (entre 85 y 115) (**Figura 1A** y **C**), mientras que para el gen *MAOA* el genotipo heterocigota fue el que presentó un menor score promedio (**Figura 1B**). Este resultado sugiere una asociación entre los genotipos de riesgo de *SLC6A4* y *FKBP5*, y un menor score de K-ABIT. Por otro lado, independientemente del genotipo y del gen analizados, se observó un desempeño general para esta prueba cercano a los límites inferiores para la población analizada (**Figura 1A**, **B** y **C**).

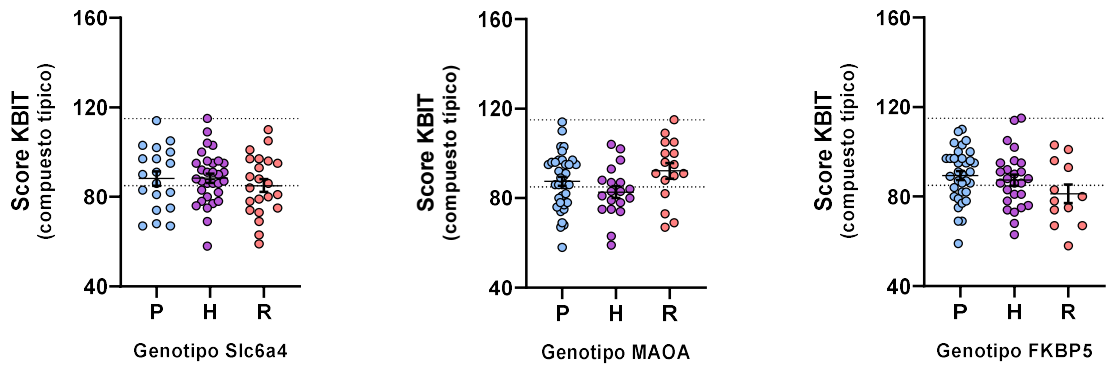


Figura 1 | *Desempeño en el K-ABIT test según los genotipos de SLC6A4, MAOA y FKBP5*. La medida de inteligencia a través del score de K-ABIT fue agrupada según los genotipos observados en la población en estudio para (**A**) *SLC6A4* (n = 72), (**B**) *MAOA* (n = 72) y (**C**) *FKBP5* (n = 72). Las líneas punteadas indican los niveles inferior y superior entre los cuales se encuentran los valores de score de K-ABIT promedio de la población de niños en general.

Al analizar las frecuencias alélicas, se pudo establecer una asociación significativa entre la presencia del alelo de riesgo del gen *FKBP5* (alelo "T") y un score K-ABIT menor al promedio (**Figura 2C**). No se encontraron diferencias en las proporciones de individuos por debajo del 85 en el score K-ABIT y la presencia de alelos para los genes *SLC6A4* y *MAOA*. Los resultados sugieren que el alelo de riesgo "T" del gen *FKBP5* podría estar asociado a un menor desempeño en el test de K-ABIT. El resto de las evaluaciones neuropsicológicas no presentaron asociaciones con los genotipos analizados.

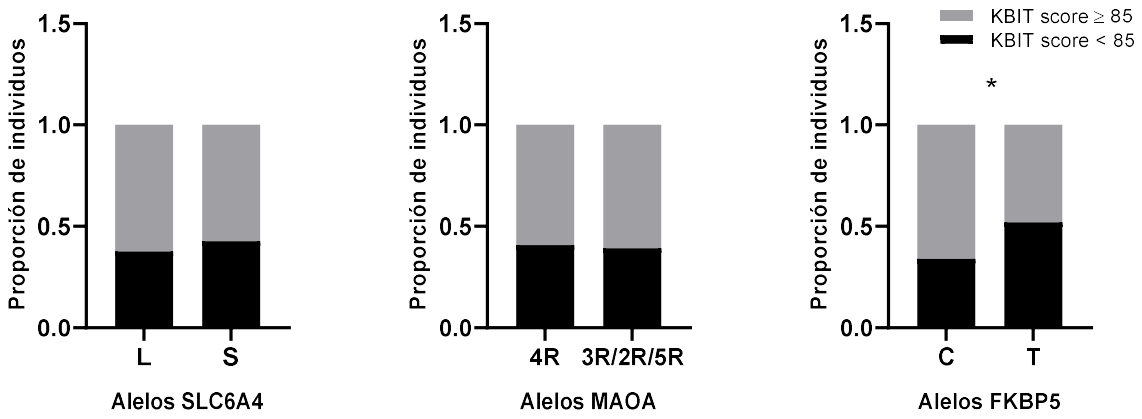


Figura 2 | *Relación entre frecuencias alélicas y score K-ABIT para los genes SLC6A4, MAOA y FKBP5*. El test de K-ABIT fue categorizado según si los individuos obtuvieron un score menos a 85 o mayor o igual a 85. Las proporciones de individuos en una y otra categoría fueron analizadas mediante test de Chi-cuadrado según los alelos para (**A**) *SLC6A4* (n = 144), (**B**) *MAOA* (n = 144) y (**C**) *FKBP5* (n = 144). * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este informe son los primeros en determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de genes cuyos polimorfismos se saben asociados a riesgo de psicopatologías basados en una muestra poblacional de niños y niñas de la Provincia de Buenos Aires.

En primer lugar, la presencia del alelo T en el gen *FKBP5* parecería estar relacionado con un menor desempeño cognitivo medido a través del K-ABIT test. La hipótesis de la cascada de glucocorticoides fue propuesta para explicar la relación entre el estrés percibido y el desempeño cognitivo [13]. En la misma, se propone que mayores niveles de estrés, que aumentan la carga de glucocorticoides, se asocian con un menor rendimiento en tests cognitivos y de memoria. El gen *FKBP5* produce una proteína regulatoria clave para la respuesta a estrés mediada por el eje HPA, y el polimorfismo de nucleótido único rs1360780 ha sido asociado a la estructura del cerebro y al estrés psicosocial [14,15,16]. En futuros experimentos sería relevante estudiar si la metilación del DNA (componente epigenético) de *FKBP5* interactúa con la exposición ambiental a

la adversidad y el genotipo de este gen para producir diferentes estados emocionales que se asocien al desempeño cognitivo.

BIBLIOGRAFÍA

1) T.O. Afifi, H.L. MacMillan, Resilience following Child Maltreatment: A Review of Protective Factors, Can. J. Psychiatry. 56 (2011) 266–272. doi:10.1177/070674371105600505.
2) T.Y. Zhang, B. Labonté, X.L. Wen, G. Turecki, M.J. Meaney, Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans., Neuropsychopharmacology. 38 (2013) 111–23. doi:10.1038/npp.2012.149.
3) K.J. Dudley, X. Li, M.S. Kobor, T.E. Kippin, T.W. Bredy, Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders, Neurosci. Biobehav. Rev. 35 (2011) 1544–1551. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.12.016.
4) N.P. Daskalakis, R.C. Bagot, K.J. Parker, C.H. Vinkers, E.R. de Kloet, The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome., Psychoneuroendocrinology. 38 (2013) 1858–73. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.06.008.
5) N. Weder, H. Zhang, K. Jensen, B.Z. Yang, A. Simen, A. Jackowski, D. Lipschitz, H. Douglas-Palumberi, M. Ge, F. Perepletchikova, K. O'Loughlin, J.J. Hudziak, J. Gelernter, J. Kaufman, Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry, J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 53 (2014) 417-424.e5. doi:10.1016/j.jaac.2013.12.025.
6) S.E.F. Claessens, N.P. Daskalakis, R. van der Veen, M.S. Oitzl, E.R. de Kloet, D.L. Champagne, Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences., Psychopharmacology (Berl). 214 (2011) 141–54. doi:10.1007/s00213-010-2118-y.
7) T. Canli, K.-P. Lesch, Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition., Nat. Neurosci. 10 (2007) 1103–9. doi:10.1038/nn1964.
8) R.H. a. van der Doelen, I. a. Arnoldussen, H. Ghareh, L. van Och, J.R. Homberg, T. Kozicz, Earvan der Doelen, R.H. a., Arnoldussen, I. a., Ghareh, H., van Och, L., Homberg, J.R., and Kozicz, T. (2015). Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact to affect DNA methylation of the corticotropin-releasing factor gene prom, Dev. Psychopathol. 27 (2015) 123–135. doi:10.1017/S0954579414001345.
9) P.A. Melas, Y. Wei, C.C.Y. Wong, L.K. Sjöholm, E. Åberg, J. Mill, M. Schalling, Y. Forsell, C. Lavebratt, Genetic and epigenetic associations of MAOA and NR3C1 with depression and childhood adversities., Int. J. Neuropsychopharmacol. 16 (2013) 1513–28. doi:10.1017/S1461145713000102.

10) D. Checknita, G. Maussion, B. Labonté, S. Comai, R.E. Tremblay, F. Vitaro, N. Turecki, A. Bertazzo, G. Gobbi, G. Côté, G. Turecki, Monoamine oxidase A gene promoter methylation and transcriptional downregulation in an offender population with antisocial personality disorder, Br. J. Psychiatry. 206 (2015) 216–222. doi:10.1192/bjp.bp.114.144964.

11) P.A. Melas, Y. Wei, C.C.Y. Wong, L.K. Sjöholm, E. Åberg, J. Mill, M. Schalling, Y. Forsell, C. Lavebratt, Genetic and epigenetic associations of MAOA and NR3C1 with depression and childhood adversities., Int. J. Neuropsychopharmacol. 16 (2013) 1513–28. doi:10.1017/S1461145713000102.

12) D. Checknita, G. Maussion, B. Labonté, S. Comai, R.E. Tremblay, F. Vitaro, N. Turecki, A. Bertazzo, G. Gobbi, G. Côté, G. Turecki, Monoamine oxidase A gene promoter methylation and transcriptional downregulation in an offender population with antisocial personality disorder, Br. J. Psychiatry. 206 (2015) 216–222. doi:10.1192/bjp.bp.114.144964.

13) R.M. Sapolsky, L.C. Krey, B.S. McEwen, The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis, Endocr. Rev., 7 (1986) 284-301. 10.1210/edrv-7-3-284.

14) C. Zimmer, H.E. Hanson, D.E. Wildman, M. Uddin, L.B. Martin, FKBP5: a key mediator of how vertebrates flexibly cope with adversity, Bioscience, 70 (2020) 1127-1138. 10.1093/biosci/biaa114.

15) A.S. Zannas, E.B. Binder, Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism, Genes, Brain Behav., 13 (2014) 25-37. 10.1111/gbb.12104.

16) P.B. Mahon, P.P. Zandi, J.B. Potash, G. Nestadt, G.S. Wand, Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults, Psychopharmacology (Berl), 227 (2013) 231-241. 10.1007/s00213-012-2956-x.

ABSTRACT

Neuronal plasticity allows mammals to continuously learn new skills, integrate new experiences and form memories that are essential for the correct development and survival of the organism. The mechanisms involved in plasticity have cellular and molecular bases that allow adaptation to different environmental contexts. Gene variants (genetic component) and altered gene expression caused by epigenetic modifications derived from environmental exposures (epigenetic component) generate changes in developmental programming of the brain. This project studied the effect of carrying specific gene variants in the genes *SLC6A4*, *MAOA* and *FKBP5* on the emotional and cognitive development of children from a school belonging to a neighborhood with a medium-low socio-economic level.

We observed that, for the risk genotypes of the *SLC6A4* and *FKBP5* genes, the sample mean of the K-ABIT score -a measure of intelligence- was below the lower limit of the average population performance for this cognitive test. When analyzing the allelic frequencies, a significant association was established between the presence of the risk allele of the *FKBP5* gene and a lower K-ABIT score. On the other hand, regardless of the

genotype and gene analyzed, we observed a general performance for this test close to the lower limit for the analyzed population.

The results presented in this report are the first to determine the genotypic and allelic frequencies of genes whose polymorphisms are known to be associated with the risk of psychopathologies based on a population sample of children from the Province of Buenos Aires. The presence of the risk allele in the *FKBP5* gene would seem to be related to lower cognitive performance. In future experiments, it would be relevant to study whether DNA methylation (epigenetic component) of *FKBP5* interacts with environmental exposure to adversity and the genotype of this gene to produce different emotional states that are associated with cognitive performance.

RIESGO POTENCIAL DE TROMBOCITOPENIA FETAL/NEONATAL ALOINMUNE ASOCIADO A GENOTIPOS DE ANTÍGENOS PLAQUETARIOS DE BAJA FRECUENCIA EN MUJERES EMBARAZADAS EN CÓRDOBA

Sebastián Blanco, Laura Carina Vega, Jorge Mario Culasso,
Luis Horacio Carrizo, Sandra Verónica Gallego

Fundación Banco Central de Sangre, Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella",
Hospital Materno Provincial "Dr. Raúl Felipe Lucini"

INFORME FINAL

Las plaquetas (PQT) son elementos formes de la sangre de 2-3 µm de diámetro, irregulares y carentes de núcleo que derivan de la fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos y desempeñan un papel fundamental en la hemostasia, evitando la pérdida de sangre y colaborando en el mantenimiento de la integridad del endotelio vascular (Blumberg et al, 2010; Zdravic et al, 2016). Entre las glicoproteínas (GP) presentes en la membrana de estos componentes sanguíneos hay elementos inmunogénicos que se expresan en formas polimórficas. Algunos de estos elementos inmunogénicos se comparten con otros tipos de células, como los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA por su designación en inglés, Human LeukocyteAntigen) o el sistema de grupo sanguíneo ABO, mientras que otros, como los Antígenos Plaquetarios Humanos (HPA por su designación en Inglés, Human PlateletAntigen), son específicos de las plaquetas (Bussel et al, 2000). Los HPA son un sistema antigénico bialélico que se hereda de manera autosómica co-dominante. En la actualidad se conocen 35 HPA (Base de datos http://www.versiti.org/hpa y Base de datos genéticos https://www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database/hpa-gene-database), enumerados de acuerdo al orden en que fueron descubiertos (HPA-1 a HPA-35) y se designan alfabéticamente de acuerdo a la frecuencia en que se presentan en la población, empleándose la letra "a" para los de alta frecuencia, "b" para los de baja frecuencia y "w" para aquellos antígenos en los que hay anticuerpos para solo uno de los dos alelos (Curtis y McFarland, 2013).Los HPA se expresan en una forma polimórfica debido a la variante de un solo nucleótido (SNV) en los genes que codifican las GP plaquetarias (Blanco et al, 2020a).Los cambios de aminoácidos resultantes de los polimorfismos de nucleótido único (SNP) inducen cambios en la estructura de las glicoproteínas para formar antígenos que son capaces de inducir la producción de aloanticuerpos (Curtis y McFarland, 2013).

La aloinmunización es una respuesta inmune a antígenos no propios de miembros de la misma especie. La aloinmunización plaquetaria ocurre en respuesta a la exposición a antígenos plaquetarios que no posee un individuo, por lo que de existir incompatibilidad antigénica entre una madre y su hijo, la aloinmunización materna ocurriría a través de la exposición durante el embarazo, cuando el feto expresa antígenos que hereda del padre y de los que carece la madre (Kroll et al, 1998; Blanco et al, 2020b). Los anticuerpos que

se forman contra los antígenos plaquetarios son clínicamente importantes en la destrucción de plaquetas, lo cual puede producir cuadros de trombocitopenia fetal y neonatal aloinmune (FNAIT, por su designación en inglés Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia) (Lochowicz et al, 2011). La FNAIT ha sido reconocida como la principal causa de morbilidad y mortalidad hemorrágica primaria en fetos y recién nacidos (Bussel et al, 2001; Skogen et al, 2010 Tiller et al, 2017), siendo una patología que puede conducir a complicaciones severas de sangrado (Winkelhorst et al, 2017b). En una mujer embarazada sensibilizada (como sería el caso de una mujer aloimnunizada durante el primer embarazo o en un embarazo previo, o aloimnunizada tras unas transfusiones), la inmunoglobulina G (IgG) pasa por la placenta y se une a las plaquetas fetales removiéndolas de la circulación. La tasa de recurrencia de FNAIT en subsiguientes embarazos se estima en 90% (Kamphuis et al, 2010). Los antígenos plaquetarios fetales se expresan en cantidades normales tempranamente (semana 16 de gestación) y el recuento plaquetario en fetos sanos alcanza los mismos niveles que en un adulto alrededor de la semana 18 de gestación (Tiller et al, 2017). Debido a que los aloanticuerpos IgG maternos generados en gestas anteriores están potencialmente disponibles para el embrión ya en la semana 6 de gestación y comienzan a aumentar pronto en el segundo trimestre (Jauniaux et al, 1995), explican que el transporte de anticuerpos maternos a través de la barrera placentaria pueden eliminar las plaquetas de la circulación fetal y producir trombocitopenia muy temprano en el embarazo.

Los HPA siguen un patrón de herencia no mendeliano: el gen que codifica estos antígenos es bialélico y se hereda de manera autosómica codominante, en donde el fenotipo de ambos alelos se expresan. Así, un individuo hereda una versión de un gen (alelo) de cada progenitor. Para la herencia del sistema HPA-1, sistema implicado en la mayoría de los casos de FNAIT (Curtis y McFarland, 2013; Winkelhorst et al, 2017a), para un individuo hijo de una madre HPA-1-negativa (genotipo HPA-1b/1b), su fenotipo HPA y el potencial riesgo de aloinmunización materna y ocurrencia de FNAIT, dependerá del alelo que este individuo herede de su padre, ya que si el genotipo paterno es HPA-1b/1b, se heredará uno de los alelos HPA-1b y el fenotipo fetal será igual que el de la madre; en cambio, si el padre tiene genotipo HPA-1a/1b hay un 50% de posibilidades que herede un alelo HPA-1a y en caso que le padre tenga genotipo HPA-1a/1a, hay un 100% de posibilidades que herede un alelo HPA-1a y que se produzca incompatibilidad con su madre.

Además del aloanticuerpo anti-HPA-1a, los anticuerpos anti-HPA 5b, 1b, -3a y -15b son los más comúnmente implicados en FNAIT en población caucásica (Peterson et al, 2013a). En los últimos años, los HPA de baja frecuencia HPA-4b, HPA-6b, HPA-9bw y HPA-21bw han estado implicados en casos de FNAIT, por lo que hoy en día están siendo estudiados (Peterson et al, 2014). Aunque la patogénesis de la FNAIT es similar a la enfermedad hemolítica del recién nacido, en la trombocitopenia aloinmune fetal no se requiere sensibilización previa y en el primer embarazo el feto puede verse afectado (Regan et al, 2019). Existe un alto riesgo de recurrencia de FNAIT en futuros embarazos (Bussel et al, 2005; Kamphuis et al, 2010; Symington et al, 2011) y el riesgo de hemorragia severa puede ser del 80 – 90 % (Tiller et al, 2017). Dado que todavía no se han implementado programas de cribado para detectar embarazos de riesgo en ningún país, el diagnóstico se establece después del hallazgo incidental de trombocitopenia neonatal o complicaciones hemorrágicas (Skogen et al, 2010; Winkelhorst et al, 2017a, Kjeldsen-Kragh, 2018; Regan et al, 2019).

La FNAIT tiene una frecuencia estimada de 0,5 a 1,5 por 1.000 nacimientos en la mayoría de las poblaciones estudiadas (Bussel et al, 2010; Curtis, 2015; Brouk and Ouela et al, 2015; Regan et al, 2019). Las presentaciones clínicas varían desde trombocitopenia leve

detectada incidentalmente en recién nacidos con signos de hemorragia en la piel como hematomas, petequias o púrpura, hasta hemorragias intracraneales (HIC) y extracraneales (HEC) en fetos y recién nacido (Bussel et al, 2010; Bussel et al, 2016; Winkelhorst et al, 2016). Se ha documentado que la HIC provoca secuelas neurológicas en el 20 % de los casos notificados y muerte en el 10 % (Delbos et al, 2016). Aunque aproximadamente el 80 % de los casos de HIC ocurren dentro del útero, también es la causa más frecuente en los recién nacidos a término (Peterson et al, 2013a). Las secuelas neurológicas en los fetos/neonatos que sobreviven a la HIC incluyen retardo mental, parálisis cerebral, ceguera cortical y convulsiones (Kamphuis et al, 2010). Las presentaciones menos frecuentes incluyen HEC como hemorragia gastrointestinal o pulmonar, hematuria y hemorragia quirúrgica después de la circuncisión (Winkelhorst et al, 2016).

Si bien se trata de una condición rara, la FNAIT es una patología seria asociada a una significante morbi-mortalidad fetal y neonatal que puede prevenirse (Regan et al, 2019). A pesar de la creciente preocupación por la atención de la salud materna, fetal y neonatal en general, la FNAIT es una entidad clínica infradiagnosticada debido al bajo grado de sospecha clínica y a que la mayoría de los casos no se detectan o son mal diagnosticados en los recién nacidos por la presentación de un cuadro clínico leve que resuelve espontáneamente. El diagnóstico generalmente se establece como un hallazgo incidental en neonatos con manifestaciones hemorrágicas o con complicaciones hemorrágicas sin otra causa aparente (Kamphuis y Oepkes, 2011). La prevención puede lograrse con la detección temprana y oportuna en los embarazos de riesgo. Así, la implementación de programas de detección de casos de FNAIT entre los estudios prenatales se ha debatido en diferentes países (Tiller et al, 2017 and 2019; Kjeldsen-Kragh et al, 2018). El objetivo de detectar en el cribado prenatal a embarazadas HPA-1a-negativas es ofrecer una intervención que reduzca el riesgo de complicaciones severas relacionadas a FNAIT (Regan et al, 2019). Existen evidencias que un programa de cribado sería clínicamente eficiente y costo-efectivo (Skogen et al, 2010). Así, el cribado durante el embarazo permitiría identificar casos de riesgo con la consecuente estratificación del riesgo y el monitoreo del embarazo, y la aplicación de un tratamiento efectivo y oportuno reducirían la morbilidad y mortalidad asociada a FNAIT. En Argentina, no existen datos de la incidencia de casos de FNAIT. Conocer la frecuencia de genotipo HPA-1a-negativos, la incidencia de FNAIT y sus complicaciones en la población de embarazadas de nuestra región es muy importante para obtener evidencias que permita tomar decisiones diagnósticas, de prevención y tratamiento a nivel de salud pública.

El presente trabajo tiene como objetivo establecer las bases del conocimiento sobre las trombocitopenias fetales/neonatales en Córdoba, aportando los primeros datos en Argentina sobre la frecuencia en que los HPA están asociados a un potencial riesgo de aloinmunización en embarazadas. Además, se aportarán los primeros datos sobre la implicancia clínica de estos genotipos HPA en las trombocitopenias aloinmunes en nuestro medio. Mediante la caracterización molecular de HPA se podrán identificar a fetos que se encuentren en riesgo y prevenir las complicaciones por incompatibilidad y se podrá evitar el riesgo de aparición de hemorragia cerebral en futuras gestaciones. Los datos que aporte este estudio, también serán de utilidad para implementar a futuro programas de asesoramiento genético a embarazadas en riesgo de trombocitopenia fetal aloinmune.

MATERIALES & MÉTODOS

Este estudio fue diseñado de acuerdo a las regulaciones provinciales y nacionales; ha sido aprobado por el Comité de Capacitación y Docencia de la Fundación Banco Central de Sangre y por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud (CIEIS) OultonRomagosa el 16 de marzo de 2016 y por el Consejo de Evaluación Ética de la Investigación en Salud (COEIS) del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba, Argentina, el 11 de mayo de 2016. La documentación que acredita la aprobación puede consultarse en el Anexo I.

El presente fue un estudio multicéntrico del cual participaron la Fundación Banco Central de Sangre, el Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" (INVIV) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba y el Servicio de Hemoterapia e Inmunohematología del Hospital Materno Provincial Dr. Raúl Felipe Lucini y se enmarca en el convenio de cooperación firmado entre las dos primeras instituciones y autorizado por resolución decanal N4479/2014.

El reclutamiento de embarazadas para determinar la frecuencia HPA de las embarazadas, del neonato y su padre en los casos que fuera necesario, fue realizado por el Servicio de Hemoterapia e Inmunohematología del Hospital Materno-provincial Dr. Raúl Felipe Lucini. Este hospital público, dependiente del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba, contaba en el año 2015 (año en que se presentó proyecto del presente trabajo de Tesis) con 5000 nacimientos entre partos y cesáreas anuales.

Para incluir a las embarazadas y neonatos en este estudio se empleó un consentimiento informado, aprobado por el CIEIS hospitalario y el COEIS provincial, donde se incluye toda la información pertinente al estudio, se aclaran los alcances e implicancias del mismo y se dejó de manifiesto que las personas tenían la libertad de retirarse del protocolo en cualquier momento si así lo decidieran.

Se reclutó a un grupo gestantes que concurrían a realizarse controles programados de embarazo y que estuvieran cursando el primer trimestre de gestación. El tamaño de muestra se estimó con el software EPIDAT 3.1 a partir del número anual de partos registrados en el Hospital Materno provincial en el año 2015 y en base a datos de la bibliografía que indican una frecuencia poblacional esperada de HPA-1a-negativos del 1%-2% (De la Vega et al, 2008; Espinoza JP, et al, 2013).

Se incluyeron en el estudio, las participantes que no tenían historia de enfermedad hematológica o disfunción plaquetaria y firmaron el consentimiento informado. Los Neonatos que se incluyeron en este estudio presentaron al momento del nacimiento un cuadro de trombocitopenia (recuento de plaquetas por debajo de 100.000/mm^3) o eran hijos de gestantes portadoras de HPA de baja frecuencia, por lo que existía un potencial riesgo de FNAIT. Fueron excluidos los casos de neonatos con trombocitopenia asociada a sepsis o con diagnóstico conocido atribuible a otra patología.

Para la realización de la genotipificación HPA se tomaron 5 ml de sangre venosa periférica en embarazadas o 500 µL en los recién nacidos en tubos Vacutanier con anticoagulante K_2EDTA. La muestra de las embarazadas fue tomada durante el control de rutina para la determinación de grupo y factor sanguíneo. Se utilizaron instrumentos de recolección de datos para la obtención de la información clínico-epidemiológica.

Durante la realización del estudio de genotipificación HPA, frente a la detección de un genotipo de baja frecuencia en alguna de las embarazadas reclutadas, se tomó una segunda muestra de sangre para corroborar el resultado obtenido y se procedió a notificar

a la gestante. Se citó y se tomó muestra, cuando fue posible, al padre de la gesta para evaluar la posibilidad de incompatibilidad en los sistemas antigénicos de baja frecuencia asociados a FNAIT. Previo a la toma de muestra, el padre recibió las explicaciones pertinentes por parte del equipo médico y firmo el consentimiento informado aprobado por el CIEIS institucional y el COEIS provincia. Se realizó una estratificación del riesgo y se planearon monitorios cercanos del embarazo.

En caso de ser necesario, se compatibilizó el genotipo plaquetario de la embarazada con los donantes reclutados en el registro de donantes de plaquetas. El donante compatible fue contactado y se le notificó sobre la potencial necesidad de una donación de plaquetas por aféresis, y se programó la misma para el momento del nacimiento.

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de muestras de sangre entera anticoagulada con K_2EDTA obtenidas de las embarazadas, el padre y el neonato (estos últimos en los casos que fue necesario) empelando el kit de extracción comercial High Pure PCR Template preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) según las especificaciones del fabricante.
Las técnicas moleculares para la genotipificación de los Antígenos plaquetarios se implementaron a partir de los protocolos descriptos por Klüter et al 1996, Cavanagh et al 1997, Skogen et al 1994, Dormoy et al 2000 y Schuh et al 2002 optimizadas en nuestro laboratorio. Estos protocolos son utilizados y fueron transferidos por el Laboratorio de Inmunohematología del Banc de Sang i Teixits (BST), Barcelona, para la optimización de las condiciones en nuestro laboratorio.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) teñidos con el colorante Sybrsafe DNA Gel Stain (Invitrogen, Molecular ProbesInc, Willow Creek Road, Eugene) y la visualización y el registro de los resultados se realizó con el sistema BioDoc-It Imaging System.

RESULTADOS

Se reclutó a un total de 200 mujeres embarazadas que cursaban el primer trimestre de gestación. Ciento ochenta (90 %) eran de nacionalidad argentina, mientras que 9 (4.5%) eran de Bolivia, 8 (4 %) de Perú, 2 (1 %) de Colombia y 1 (0.5 %) de Uruguay. El grupo estuvo compuesto por 133 mujeres (66.5 %) embarazadas por primera vez, 36 (8 %) habían tenido una gesta previa, 21 (10.5 %) 2,5 (2.5 %) 3, 2 (1 %) 5 y 1 (0.5 %) 6 gestas. En esta cohorte, 32 (16 %) mujeres tenían antecedentes de un aborto previo, 4 (12.5 %) dos y 3 (9.5 %) más de dos abortos.

La edad promedio de las participantes fue de 24 años (mediana 23, moda 17, rango 14-43). La frecuencia de genotipo HPA de la población estudiada se muestra en la tabla 5 y la frecuencia de los alelos HPA en la tabla 1.

Tabla 1: Frecuencia de los Genotipos HPA en la población de embarazadas estudiada.

	Embarazadas (n=200)	
Genotipo HPA	Media (%)	Binomio exacto (95% Intervalo de Confianza)
1a1a	83.6	77.83 – 88.48
1b1b	1.5	0.31 – 4.28
1a1b	14.9	10.25 – 20.52
2a2a	67	60.39 – 73.74
2b2b	5.5	2.75 -9.53
2a2b	27.5	21.22 - 33.92
3a3a	41.6	34.71 – 48.71
3b3b	11.4	7.36 - 16.59
3a3b	47	39.99 – 54.16
4a4a	99	96.47 - 99.88
4b4b	0	0 – 1.81*
4a4b	1	0.12 –3.53
5a5a	84.6	78.93 – 89.33
5b5b	0.5	0.01 – 2.73
5a5b	14.9	10.245 – 20.52
6a6a	1	98.19 – 1*
6b6b	0	0 – 0.18*
6a6b	0	0 - .018*
9a9a	1	98.19 – 1*
9b9b	0	0 - .018*
9a9b	0	0 - .018*
15a15a	29.2	23.04 – 36.0
15b15b	15.8	11.1 – 21.62
15a15b	55	47.81 – 61.94

* Un lado, 97.5% intervalo de confianza

Los alelos más frecuentemente asociados a FNAIT en población caucásica fueron detectados en la población estudiada. Los alelos HPA-6 y HPA-9 no fueron detectados en esta población.

Se identificaron a 3/200 (1.5 %) mujeres embarazadas HPA-1a-negativas. Se solicitó segunda muestra para confirmar el genotipo plaquetario y también se tomó una muestra de sangre a los padres de la gesta, siendo posible obtener muestra a 2 de los 3 padres. Corroborado el genotipo HPA materno, se procesaron las muestras paternas y se procedió al monitoreo y la estratificación del riesgo de FNAIT. Donantes de plaquetas compatibles fueron identificados y reclutados a partir del registro de donantes de plaquetas de FBCS.

Durante el monitoreo, los embarazos se desarrollaron con normalidad. Al momento del nacimiento, se realizó el recuento de plaquetas de los recién nacidos y, en los casos que fue necesario, se realizó la genotipificación fetal.

En un caso, el neonato heredó de su padre el alelo HPA-1b, con lo cual su genotipo era compatible con el genotipo materno. En los otros dos casos, se detectó una incompatibilidad entre los neonatos y sus madres. Solo uno de los neonatos requirió transfusión de plaquetas por haber presentado un bajo recuento plaquetario (<50 x $10^3/mm^3$).

Además de estos casos, se detectaron otros 3 (tres) casos de FNAIT: Uno debido a incompatibilidad en el sistema HPA-3, otro de incompatibilidad en el sistema HPA-15 y un tercer caso en el sistema HPA-1. Solo en el caso en que se detectó incompatibilidad en el sistema HPA-15 se presentó como un cuadro de trombocitopenia moderada (recuento entre 50 x $10^3/mm^3$ y 100 x $10^3/mm^3$ plaquetas), requirió la internación y el monitoreo del recién nacido. El recuento de plaquetas comenzó a normalizarse de manera espontánea en las 72 horas de nacimiento. El tercer caso (incompatibilidad en el sistema HPA-1) fue sospechado durante el nacimiento, ya que el neonato presentaba manifestaciones hemorrágicas. La sospecha y el diagnóstico temprano de FNAIT fueron posibles por el hecho de que la gestante formaba parte del estudio. Para este caso, se requirió de transfusión de plaquetas.

DISCUSIÓN

A pesar de que la FNAIT ha sido reconocida como la principal causa de morbilidad y mortalidad hemorrágica primaria en fetos y recién nacidos (Peterson et al, 2013a; Blanco et al, 2020b), los programas de cribado para detectar embarazos en riesgo aún no se han implementado en ningún país. Además, a pesar de la creciente preocupación por la atención de la salud materna, fetal y neonatal en general, esta enfermedad potencialmente letal todavía está subdiagnosticada debido al bajo grado de sospecha clínica, y la mayoría de los casos pasan desapercibidos. Es por esto que muchos fetos y recién nacidos carecen de la ventaja de la intervención médica temprana para minimizar las consecuencias del sangrado producido por la incompatibilidad en los antígenos plaquetarios.

El actual entendimiento de la FNAIT y su fiosiopatogénesis deriva de estudios retrospectivos (Skogen et al, 2010). FNAIT es una enfermedad aloinmune caracterizada por trombocitopenia fetal o neonatal debido a anticuerpos plaquetarios maternos dirigidos contra las glicoproteínas de la membrana plaquetaria fetal. En los recién nacidos, los casos de FNAIT suelen detectarse al nacer, cuando se observan signos de sangrado en el neonato en ausencia de cualquier otra afección que pueda provocar una disminución del recuento plaquetario (Curtis, 2015). Los casos de FNAIT no se identifican fácilmente y en la actualidad la mayoría de ellos se tratan de forma empírica por lo que la mayoría de los casos no están diagnosticados ni informados por los médicos (Skogen et al, 2010; Kamphuis et al, 2011; Zdravic et al, 2016; Tiller et al, 2017; Regan et al, 2019). Esto ha quedado en evidencia en nuestra región ya que, en un año, se confirmaron tres casos de FNAIT. Previo a este hecho, no hay registros de casos sospechados/diagnosticados en Córdoba ya que las trombocitopenias se trataban empíricamente y, tras la resolución del cuadro clínico, se otorgaba el alta al paciente sin un diagnóstico etiológico.

Para reducir la morbilidad y la mortalidad relacionadas con la trombocitopenia en fetos y recién nacidos, la preocupación clínica debe centrarse en el diagnóstico precoz y el seguimiento de los casos. El retraso en el diagnóstico también se asocia con un mayor costo de la atención médica para los pacientes, las familias y el sistema de salud pública. La FNAIT debe sospecharse fuertemente en casos de trombocitopenia neonatal sin evidencia de enfermedades infecciosas o sistémicas, anomalías esqueléticas asociadas

con trombocitopenia y en ausencia de antecedentes maternos de enfermedades autoinmunes, trombocitopenia o consumo de cualquier fármaco que pueda causar trombocitopenia (Winkelhorts et al, 2017;). Así lo demuestran los casos detectados en este trabajo.

La FNAIT tiene una frecuencia estimada de 0,5 a 1,5 por 1.000 nacidos vivos (Brouk et al, 2015), pero esta frecuencia no incluye los abortos espontáneos (Zdravic et al, 2016). Además, dado que el diagnóstico generalmente se establece después del nacimiento en recién nacidos con síntomas de hemorragia, muchos casos de FNAIT con trombocitopenia leve a moderada no se diagnostican. Por tanto, la incidencia de FNAIT no se ha estudiado adecuadamente y la entidad clínica podría estar subestimada (Zdravic et al, 2016; Blanco et al, 2020b). En un estudio previo en nuestro país, De la Vega et al informaron, seis casos confirmados o altamente sospechosos de FNAIT durante 9 años, lo que proporciona una tasa de detección clínica de FNAIT de 1 caso en 25.500 nacidos vivos (De la Vega et al, 2008). Una publicación previa de este grupo de trabajo (Blanco et al, 2020b) reporta que, producto de la sospecha médica, se detectaron tres casos de incompatibilidad HPA y un caso que no pudo confirmarse en el período de un año. Considerando que Córdoba tiene un número de nacimientos similar (alrededor de 14.600/año) a las tasas reportadas por estos autores para Rosario, habría una subestimación de los casos FNAIT en el estudio mencionado. En la realización de este trabajo de investigación, durante el estudio de genotipificación HPA de gestantes se detectaron 4 casos de FNAIT: tres de ellos producidos por incompatibilidad en el sistema HPA-1, detectándose en dos gestantes HPA-1b/1b y sus recién nacidos HPA-1a/1b y una gestante HPA-1a/1a y su hijo HPA1a/1b y uno caso debido a incompatibilidad en el sistema HPA-15. En dos de estos casos se requirió la transfusión de plaquetas. Teniendo en cuenta que estos casos fueron detectados por haber sido incluidas las gestantes en este estudio, podemos inferir que no solo que esta entidad clínica es subdiagnosticada en nuestro medio sino, que la incidencia poblacional es mayor a la informada por otros autores. La principal razón puede deberse a que en nuestro estudio, se han evaluado los HPA más frecuentemente implicados en trombocitopenia, mientras que los estudios de cribado prenatal generalmente solo se centran en la detección de gestantes HPA-1b/1b (Kamphuis et al, 2010; Peterson et al, 2013a; Curtis B, 2015; Tiller et al, 2017).

El genotipo HPA-1b/1b es la causa más común y clínicamente relevante de FNAIT en las poblaciones caucásicas, ya que el 75-85% de los anticuerpos de origen materno se dirigen a HPA-1a (Zdravic et al, 2016). Se ha reportado que la FNAIT producto de anticuerpos anti-HPA-1a puede reconocerse en 1 de 1250 embarazos en población caucásica, con una incidencia de HIC en 1 de 12.500 a 1 en 25.000 embarazos (Skogen et al, 2010). Como se mencionó en párrafos anteriores, estos datos parecen estar subestimados y, en parte, esto puede deberse a que muchos casos no son registrados o diagnosticados correctamente por falta de sospecha clínica. La FNAIT se reconoce incidentalmente en un recién nacidos con signos obvios de sangrado (Curtis B, 2015) pero sin la sospecha clínica oportuna, un recién nacido con una trombocitopenia leve a moderada sin signos de sangrados no será diagnosticado y el caso no quedará registrado. Los anticuerpos contra los antígenos HPA-1a no solo causan destrucción e inhiben la producción de plaquetas, sino que también afectan la integridad vascular y la angiogénesis, lo que aumenta el riesgo de complicaciones hemorrágicas intracraneales y extracraneales en fetos y recién nacidos (Winkelhorst et al, 2017b). El sistema antigénico HPA-1 se expresa constitutivamente en la glicoproteína (GP) IIIa, una integrina β3 que forma un heterodímero con αIIb o αv en las plaquetas. Mientras que la integrina αIIbβ3 se expresa casi exclusivamente en plaquetas y sus megacariocitos precursores, αvβ3 también se encuentra en células

trofoblásticas, células endoteliales y células progenitoras endoteliales, células de músculo liso y diferentes células cultivadas (Santoso et al, 2016). Dado que las células progenitoras endoteliales pueden desempeñar un papel clave en la angiogénesis y desarrollo placentario, los anticuerpos contra el polimorfismo del sistema HPA-1 pueden afectar el desarrollo fetal y placentario. Recientemente, Santoso et al demostraron que el deterioro de la angiogénesis por anti-HPA1a de anti-αvβ3 parece ser responsable de la HIC asociada a FNAIT (Santoso et al, 2016). En el estudio de genotipificación HPA en gestantes, se detectaron tres embarazadas HPA-1a-negativas. El estudio de seguimiento permitió detectar incompatibilidad neonatal en dos de estos casos, requiriéndose transfusión de plaquetas solo en uno de los casos. Este resultado concuerda con los hallazgos del estudio de cribado e intervención noruego en que la mitad de los neonatos de madres HPA-1a-negativas tenían un recuento de plaquetas normal al nacimiento y solo el 20% presentó trombocitopenia severa (Kjeldsen-Kragh et al, 2007). Se reporta aquí un caso de incompatibilidad en embarazada HPA-1a-negativa entre los casos sospechosos por clínica. Este último, si bien se presentó también con trombocitopenia severa y requirió de transfusión de plaquetas. En ninguno de los dos casos que requirieron transfusión había signos de HIC. Por otro lado, aun no se conoce con exactitud el rol del polimorfismo en los otros sistemas HPA y su papel en FNAIT. Zdravic et al sugirieron que los casos de anti-HPA-2a pueden no ser fácilmente identificados e informados por los médicos, y también que aunque los casos de FNAIT mediada por anti-HPA-3a son relativamente raros, generalmente son graves y pueden causar abortos espontáneos (Zdravic et al, 2016). En este sentido, Wu et al informaron de HIC en un segundo hijo de una mujer homocigota HPA-3b (Wu et al, 2015); este es uno de los pocos informes existentes y aún se desconoce la frecuencia de HIC en HPA-3. Entre los casos de incompatibilidad detectados en este trabajo, hay un caso en el sistema HPA-3 y otro en el sistema HPA-15. Solo el segundo caso se presentó como un cuadro de trombocitopenia moderada (recuento entre 50 x $10^3/mm^3$ y 100 x $10^3/mm^3$ plaquetas), y requirió la internación y el monitoreo del recién nacido. Entre los casos estudiados por sospecha clínica y reportados en una publicación realizada por este grupo (Blanco et al, 2020b), se comunicaron dos casos de incompatibilidad en el sistema HPA-15; ambos neonatos presentaron una trombocitopenia severa pero no mostraron signos de HIC. No obstante, uno de esos casos se presentó con sangrado pulmonar (HEC). Aunque la mayoría de las publicaciones y directrices de FNAIT se centran en la aparición y prevención de la HIC, la FNAIT puede provocar complicaciones hemorrágicas graves distintas de la HIC en los recién nacidos. El neonato detectado por sospecha clínica con sangrado pulmonar en Córdoba (Blanco et al, 2020b), corresponde a un caso con HEC. Este caso es muy interesante porque se trata de un caso que podría no haber quedado sin diagnóstico. El historial de este caso reveló un padre con enfermedad de Von Willebrand, un primer hijo nacido con trombocitopenia y sin diagnóstico y un médico otorgando al caso el diagnóstico etiológico de Von Willebrand congénito. Sin la disponibilidad de las herramientas moleculares, la determinación de dicho diagnóstico no se habría establecido.

Uno de los principales desafíos en relación con FNAIT es el diseño de intervenciones apropiadas, como la implementación de programas de atención de la salud materno-infantil, incluida la detección temprana de embarazos en riesgo, y/o medidas preventivas para reducir los riesgos a nivel individual y poblacional (Kjeldsen-Kragh et al, 2008; Skogen et al, 2010). Se ha sugerido y debatido en el mundo la implementación de programas de detección prenatal para identificar embarazos de riesgo. Un estudio realizado por Tiller et al demostró una tasa de detección de FNAIT en una población no sometida a cribado de 7,5 casos por año, basándose únicamente en las indicaciones clínicas, en comparación con 53 casos detectados cuando se aplicó el cribado (Tiller et

al, 2009). El cribado FNAIT se centra en la detección de anticuerpos de la madre. Sin embargo, esos anticuerpos pueden estar ausentes, como se ha informado anteriormente (Kaplan et al, 1992; Rayment et al, 2003; Nomura et al, 2010). Algunas mujeres HPA-1b/1b producen anticuerpos anti-HPA1a que son no detectables y aun así dan a luz a neonatos que son trombocitopénicos (Curtis, 2015). Diferentes estudios han confirmado el potencial patogénico de los anticuerpos maternos de baja avidez específicos anti-HPA-1a no detectables por métodos convencionales, con lo cual pueden causar FNAIT (Bakchoul T et al, 2011; Peterson et al, 2013b). También se ha reportado la dificultad de detectar anticuerpos anti-HPA3a y anti HPA-3b (Peterson et al, 2013a). Por tanto, la detección de anticuerpos como único método presenta limitaciones significativas. Además, los anticuerpos contra HPA de baja frecuencia pueden ser extremadamente difíciles de detectar (Peterson et al, 2014) y también se ha informado que ciertos sistemas de detección no detectan anticuerpos anti-HPA3a (Hayashi e Hirayama, 2015). Los programas de cribado FNAIT deben tener en cuenta este hecho, como así también el hecho que para una estratificación del riesgo es necesario conocer los antígenos que posee el padre, lo cual puede logarse a través de la genotipificación. Desde la determinación de las bases moleculares de HPA y el desarrollo de técnicas moleculares para la detección de SNP, la tipificación del antígeno serológico original ha sido reemplazada en gran medida por la tipificación del ADN (Nogués, 2011). La genotipificación de HPA permite determinar la incompatibilidad de HPA. El cribado molecular materno permite identificar embarazos con riesgo FNAIT y, según el genotipo paterno, permitiría un seguimiento estrecho del caso y consiguiente estratificación del riesgo de esos embarazos. Así, en un estudio prospectivo de cribado e intervención llevado a cabo en Noruega, el cribado prenatal mediante genotipificación HPA para la detección de alelos HPA-1 y HPA-1b se realizó en 100000 embarazadas, detectándose un 2.1% de gestantes HPA-1b/1b y en riesgo de dar a luz a un infante afectado por FNAIT (Kjeldsen-Kragh et al, 2007). Este estudio de cribado prenatal e intervención resultó en un 75% de reducción de riesgo comparado a estudios de cribado similares reportados previamente (Curtis, 2015). El estudio de genotipificación HPA en embarazadas desarrollado en este trabajo de investigación permitió detectar 1.5 (3/200) gestantes HPA-1b/1b. Los datos obtenidos en este estudio demuestran la importancia de considerar la FNAIT en los entornos de atención de la salud fetal y perinatal en Argentina, pero además demuestra la utilidad de las herramientas moleculares en el diagnóstico precoz de esta entidad clínica. Las estrategias para abordar la salud materna, fetal y perinatal, así como las políticas de prevención orientadas a reducir la morbilidad y mortalidad fetal y neonatal, deben enfocarse en ofrecer atención prenatal de calidad e identificar los factores de riesgo. Dado que el diagnóstico temprano de FNAIT conduce a un resultado exitoso en la mayoría de los casos, las autoridades de salud pública deberían implementar programas de detección prenatal para detectar embarazos de alto riesgo. Las herramientas moleculares, como aquí se demuestra, ofrecen una oportunidad para la prevención de las formas graves de FNAIT a través de la detección y el diagnóstico precoz de embarazos de riesgo. Hay que destacar además que ninguna de las gestantes reclutadas en este estudio rechazó la invitación, y todas se mostraron interesadas en formar parte del mismo. En este sentido, un estudio reportado por Winkelhorst et al, se evaluó la actitud de las mujeres frente a un programa de cribado, encontrando una actitud positiva en el 91% de los casos (Winkelhorst et al, 2017c). Se ha planteado que un programa de cribado debe integrar educación, testeos, servicios clínicos y un protocolo de manejo (Skogen et al, 2010). La realización de este trabajo implicó lo antes mencionado, lo cual demuestra que en nuestro medio existen las herramientas y disponibilidades para la implementación de este tipo de programas de cribado prenatal. El estudio de Winkelhorst et al, mostró que el 94 % de las mujeres

presentó actitud positiva frente al programa de cribado y que su actitud se basó en la recepción de información suficiente lo cual se logró con la adaptación de la conserjería al origen étnico y nivel educativo de las participantes (Winkelhorst et al, 2017c). Así, la actitud positiva del grupo de gestantes reclutadas para el estudio de genotipificación HPA, independientemente del variado origen étnico de las participantes, y del nivel educativo que las mujeres que asistieron al centro de salud, demuestra que es posible lograr una alta aceptación a la realización de este estudio. La evidencia científica brindada en este trabajo evidencia que, en el ámbito clínico de Córdoba, es posible implementar un programa que promueva equidad y acceso al screening a la población de embarazadas.

SÍNTESIS

La trombocitopenia fetal y neonatal aloinmune (FNAIT) no es un evento común en el embarazo, pero conlleva un riesgo significativo de complicaciones fetales y/o neonatales graves y ha sido reconocida como la principal causa de morbilidad y mortalidad hemorrágica primaria en fetos y recién nacidos. A pesar de esto, los programas de cribado para detectar embarazos en riesgo aún no se han implementado en ningún país. Además, a pesar de la creciente preocupación por la atención de la salud materna, fetal y neonatal en general, esta enfermedad potencialmente letal todavía está sub-diagnosticada.

Con objetivo de resaltar la importancia de diagnosticar la FNAIT en los entornos de atención de la salud fetal y perinatal, y mostrar la utilidad de las herramientas moleculares en el diagnóstico precoz de esta entidad clínica, en este trabajo se propone identificar en Córdoba a mujeres embarazadas que sean portadoras de antígenos plaquetarios de baja frecuencia y evaluar la incidencia de casos de FNAIT en los neonatos de las mujeres embarazadas que sean portadoras de antígenos plaquetarios de baja frecuencia.

Se estimó la obtención de 200 muestras de mujeres embarazadas para establecer la frecuencia de HPA. Este tamaño de muestra se seleccionó con un nivel de confianza del 95%, un error máximo admitido del 5% y un valor de prevalencia estimado según lo conocido por la bibliografía. Las muestras de sangre anticoagulada con K_2EDTA de mujeres embarazadas se tomaron durante su control de rutina. La genotipificación se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa primer secuencia específica (PCR SSP) partir de los protocolos descriptos por Klüter et al 1996, Cavanagh et al 1997, Skogen et al 1994, Dormoy et al 2000 y Schuh et al 2002, seguida de electroforesis y visualización de bandas de ADN. La presencia de los alelos de HPA resultantes se registró en planillas de Excel, para luego ser analizadas las frecuencias de los mismos en función del número total de muestras analizadas. En los casos en que se detectaron genotipos de antígenos plaquetarios que pudieran producir trombocitopenia, el personal médico del Servicio de Hemoterapia e Inmunohematología del Hospital Materno-Provincial Dr. Raúl Felipe Lucini le comunicó al paciente la posible implicancia clínica de dicho hallazgo y se tomaron las medidas adecuadas para el caso.

Como resultado de este trabajo, se detectaron en la población de gestantes estudiada los alelos más frecuentemente asociados a FNAIT en población caucásica. Se identificó a 3/200 (1.5%) mujeres embarazadas HPA-1a-negativas, detectándose incompatibilidad entre el neonato y la madre en dos casos. Solo uno de los neonatos requirió transfusión de plaquetas. Además de estos casos, se detectaron otros 3 (tres) casos de FNAIT: uno debido a incompatibilidad en el sistema HPA-3, otro en el sistema HPA-15 y un tercer caso en el sistema HPA-1.

Este trabajo constituye el primer reporte en Argentinade genotipos HPA de baja frecuencia en población de mujeres embarazada y de casos de FNAIT confirmados por evidencia molecular. Estos resultados refuerzan la relevancia del diagnóstico precoz de esta entidad clínica. Dado que el retraso en el diagnóstico de FNAIT podría tener consecuencias graves en el feto y en los recién nacidos, las estrategias para abordar la salud materna, fetal y perinatal, así como las políticas de prevención dirigidas a reducir la morbilidad y mortalidad fetal y neonatal, deben enfocarse en implementar programas para identificar embarazos de riesgo y así reducir las complicaciones relacionadas con la trombocitopenia en fetos y recién nacidos.

ABSTRACT

Introduction: Even though Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (FNAIT) has been recognized as the main responsible for morbidity and mortality associated to primary hemorrhagic in fetuses and newborns, screening programs to detect pregnancies at risk have not yet been implemented. Moreover, in spite of increased concerns about maternal, fetal and neonatal health care in general, this potentially lethal disease is still underdiagnosed. The purpose of this report is to highlight the importance of considering FNAIT in fetal and perinatal health-care settings.

Methods: We invited and recruited voluntary pregnant women who attended to Hospital Materno Provincial within a year. DNA was extracted from K_2EDTA-anticoagulated whole blood and genotyping was performed by PCR, using sequence-specific primers for typing HPA-1 to -6, -9 and -15 systems.

Results: A cohort of 200 pregnant women was recruited and characterized and a database with their genotype for the most relevant HPA alloantigens was created. The alleles most frequently associated with FNAIT in Caucasian population were detected. We identified 3/200 pregnant women (1.5%) HPA-1a-negative. Incompatibility between mother and newborn was detected in two cases. Only one of the infants required platelet-transfusion. Other 3 (three) FNAIT-cases were detected: one due to incompatibility in the HPA-3, another in HPA-15 and a third case in HPA-1 system.

Conclusion: This is the first study showing low frequency HPA genotypes in a pregnant women and the first report of FNAIT cases confirmed by molecular evidence in Argentina. This report reinforces the relevance of early diagnosis of this clinical entity. Since the delay in FNAIT diagnosis could leads to severe consequences, strategies to approach maternal, fetal and perinatal health, as well as prevention policies aimed to reduce fetal and neonatal morbidity and mortality should focus on implementing programs to identify high-risk pregnancies and thus reduce thrombocytopenia-related complications in fetuses and newborns.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Bakchoul T, Kubiak S, Krautwurst A, Roderfeld M, Siebert HC, Bein G, Sachs UJ, Santoso S: Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. Transnf 2011; 51(11)2455-2461. Doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03171.x.

[2] Blanco S, Frutos MC, Carrizo LH, Nogués N and Gallego SV: Establishment of the first platelet-donor registry in Argentina. Blood Transfusion 2020a; doi: 10.2450/2020.0018-20.

[3] Blanco S, Vega LC, Carizzo LH, Culasso JM and Gallego SV: Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a late or missed diagnosis disease in fetal and perinatal health-care settings. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 2020b. DOI. 10.1080/14767058.2020.1716713.

[4] Blumberg N, Heal JM and Phillips GL: Platelet transfusion: trigger, dose, benefits and risks. F1000 Med Rep 2010; 2:5; DOI:10.3410/M2-5.

[5] Brouk H, Ouela H: Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Advance in laboratory diagnostic and management.In J Blood Res Dis 2015; 2(1):013 doi: 10.23937/2469-5696/1410013.

[6] Bussel JB, Kunicki TJ and Michelson AD: Platelets: New understanding of platelet glycoproteins and their role in disease**.**AmerSocHemat 2000; 222-239.

[7] Bussel JB: Alloimmune thrombocytopenia in the fetus and newborn. SeminThrombHemost 2001; 27(3):245-252. Doi 10.1055/s-2001-15254.

[8] Bussel JB, Zacharoulis S, Kramer K, et al: Clinical and diagnostic features of neonatal alloimmune thrombocytopenia: comparison to non-immune cases of thrombocytopenia**.**Pediatr Blood Cancer 2005; 45:176-83.

[9] Bussel JB, Berkowitz RL, Hun C. et al: Intracraneal Hemorrhage in alloimmune Thrombocytopenia: stratified management to prevent recurrence in the subsequence affected fetus**.** Am J ObstetGynecol 2010; 203:135e1-14.

[10] Bussel JB What do why know about intracranial hemorrhage in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia?Transf Med 2016; 56:17-18.

[11] Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE and Metcalfe P: HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. Transfusion Medicine 1997: 7: 41-45.

[12] Curtis BR and McFarland JG: Human platelet antigen 2013. Vox Sang 2014;106(2):93-102 doi:10.1111/vox.12085.

[13] Curtis BR: Recent progress in understanding the pathogenesis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Br J Haematol 2015;171(5):671-82 doi:10.1111/bjh.13639.

[14] De la Vega Elena CD, Nogués N, Fernández Montoya A, et al: Human platelet specific antigens frequencies in the Argentinean population. Transfus Med 2008;18(2):83-90; doi: 10.1111/j.1365-3148.2007.00819.x.

[15] Delbos F, Bertrand G, Croisille L, et al:Fetal and Neonatal alloimmune thrombocytopenia: predictive factors of intracranial hemorrhage**.** Transf 2016; 56:59-66. doi: 10.1111/trf.13274.

[16] Dormoy A, Hanau D, Tongio MM, Cazenave JP: Development and validation of a genotyping kit for the eight principal human platelet alloantigen systems. TransfClinBiol 2000;7(1):51-62 doi: 10.1016/s1246-7820(00)88712-1.

[17] Hayashi T and Hirayama F: Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies and genotyping. Blood Transfus 2015; 13:380-90 doi: 10.2450/2015.0275-14.

[18] Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, et al: Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. Hum Reprod 1995; 10(12):3297-3300. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135906 .

[19] Kamphuis MM, Paridaans N, Porcelijn L, de Haas M, van der Schoot CE, Brand A, Bonsel GJ y Oepkes D: Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systemic review. BJOG 2010; 117:1335-1343 doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02657.x.

[20] Kamphuis MM and Oepkes D: fetal and Neonatal alloimmune thrombocytopenia: prenatal interventions. PrenatDiagn 2011; 31:712-719 doi: 10.1002/pd.2779.

[21] Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, Golebiowska E, Randen I, Hauge R et al: A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. Blood 2007;10(3):833-839 doi:10.1182/blood-2006-08-040121.

[22] Kjeldsen-Kragh J, Husebekk A, KæjerKillie M et al:Is it time to include screening for neonatal alloimmune thrombocytopenia in the general antenatal health care program?TransfApherSci 2008; 38(3):183-188. doi:10.1016/j.transci.2008.04.010.

[23] Kjeldsen-Kragh J: Screening for fetal and noenatalalloimmune thrombocytopenia: is it possible what aret he potential outcomes? ISBT Science Series 2018; 13:187-193 doi:10.1111/voxs.12379.

[24] Klüter H, Fehlau K., Panzer S, Kirchner H Bein G: Rapid Typing for Human Platelet Antigen Systems –1, -2, -3 and –5 by PCR Amplification with Sequence-Specific Primers. VoxSanguinis 1996: 71: 121-125.

[25] Kroll H, Kiefel V, Santoso S: Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. Vox Sang 1998:74(2):345-354.

[26] Lochowicz Andrew J., Curtis Brian R. Clinical Applications of platelet Antibody and Antigen testing. Labmedicine. 2011; 42 (11); 687-692.

[27] Nogués, N: Molecular testing for platelet and granulocyte antigens. State of The art. ISBT Science Series (2011):6, 7-12.

[28] Nomura ML, Couto E, MoraesMartinelli B, et al:Fetal genotyping for platelets antigens: a precise tool for alloimmune thrombocytopenia: case report and literature review. Arch GynecolObstet 2010; 282:573-575. doi: 10.1007/s00404.010-1415-3.

[29] Peterson JA, Balthazor SM, Curtis BR, et al: Maternal alloimmunization against the rare platelet-specific antigen HPA-9b (Max a) is an important cause of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion 2005; 45(9):1487–95; DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00561.x.

[30] Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR et al: Neonatal AlloimmuneThrombocitopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Br J Haematol 2013a; 161(1):3-14 doi:10.1111/bjh.12235.

[31] Peterson JA, Kanack A, Nayak D, Bougie DW, McFarland JGCurtis BR, Aster RH: Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy. Trasnf 2013b; 53(6):1309-131 doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03903.x.

[32] Peterson JA, Gitter M, Bougie DW, et al: Low-frequency human platelet antigens as triggers for neonatal alloimmune thrombocytopenia**.** Transfusion 2014; 54(5):1286-93; DOI: 10.1111/trf.12450.

[33] [] Rayment R, Birchall J, Yarratanton H, et al:Neonatal alloimmune thrombocytopenia. BMJ2003; 327:331-332.

[34] Regan F, Lees CC, Jones B, Nicolaides KH, Wimalasundera RC, Mijovic A, on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologist. RCOG Scientific Impact paper 2019; 61:2-13 doi: 10.1111/1471-0528.15642.

[35] Santoso S, Wihadmadyatami H, Bakchoul T, Werth S, Al-Fakhri N, et al: Antiendothelialαvβ3 antibodies are the major cause of intracranial bleeding in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. ArteriosclerThromVascBiol 2016; 36:1517-1524 doi10.1161/ATVBAHA.116.307281.

[36] Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JY, Campbell K, Sutherland DR, Metcalfe P, Horsfall W, Ouwehand WH: "A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens". Blood 2002; 99(5): 1692-1698.

[37] Skogen B, Bellissimo DB, Hessner MJ, et al. Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. Transfusion 1994; 34: 955-60.

[38] Skogen B, KæjerKillie M, Kjeldsen-Kragh J, Ahlen MT, Tiller H, Stuge TB and Husebekk A: Reconsidering fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia with a focus on screening and prevention. Expert review of hematology2010; 3(5):559-566. doi: 10.1586/ehm.10.49.

[39] Symington A and Paes B:Fetal and Neonatal Alloinmune Thrombocytopenia: Harvesting the evidence to develop a clinical Approach to Management. Am J Perinatol 2011; 28:137-144.

[40] Tiller H, KæjerKillie M, Skogen B, et al:Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Norway: poor detection rate with no screening versus a general screening program**.** BJOG 2009; 116(4):594-598. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.02068.x.

[40] Tiller H, Husebekk A, Ahlen MT, et al: Current perspectives on fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia - increasing clinical concerns and new treatment opportunities. Int J Womens Health 2017:9:223-34; DOI: 10.2147/IJWH.S90753.

[41] Tiller H, Ahlen MT, AkköK ÇA and Husebekk A: Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia – The Norwegian management model. TransfusApherSci 2020;59(1):102711 doi:10.1016/j.transci.2019.102711.

[42] Winkelhorst D, Kamphuis MM, de Kloet LC, et al: Severe bleeding complications other than intracranial hemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia: a case series and review of the literature. Transf 2016; 56:1230-1235. doi: 10.1111/trf.13550.

[43] Winkelhorst D, Murphy MF, Greinacher A, et al: Antenatal management in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. Blood 2017a; 129(11):1538-1547. doi:10.1182/blood-2016-10-739656.

[44] Winkelhorst D, Oepkes D y Lopriore E: Fetal and Neonatal alloimmune Thrombocytopenia: evidence based antenatal and postnatal management strategies. Expert Review of Hematology 2017b; 10(():729-737 doi: 10.1080/17474086.2018.1346471.

[45] Winkelhorst D, Loeff R, van den Akker-van Marle ME, de Haas M and Oepkes D: Women´s attitude towards routine human platelet antigen-screening in pregnancy. AOGS 2017c; 96:991-997 doi:10.1111/aog.13150.

[46] Yougbare I, Zdravic D y Ni H: Angiogenesis and bleeding disorders in FNAIT. Impact journal 2015; 6:15724-25725.

[47] Zdravic D, Yougbare I, Vadasz B, Li C, Marshall AH, Chen P, Kjeldsen-Kragh J and Ni H: Fetal and neonatal alloimnune Thrombocytopenia. Seminaris in Fetal & Neonatal Medicine 2016; 21:19-27.

DETECCIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES Y ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN ESPACIOS VERDES DE RECREACIÓN INFANTIL

Ximena Blanco Crivelli

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Cátedra de Microbiología

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli shigatoxigénico (STEC) es un patógeno de presentación endémica señalado como la principal etiología de síndrome urémico hemolítico (SUH). Argentina es el país con mayor casuística a nivel mundial. Durante el 2019 se notificaron 290 casos de SUH (Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N481, 2020). Un total de 232 afectaron a niños menores a 5 años, la incidencia acumulada hasta la semana 52 fue de 6,23 casos cada 100.000 menores de 5 años. *E. coli* enteropatógeno (EPEC) constituye otro patovar de *E. coli* con impacto en la Salud Pública debido a que causa diarrea infantil potencialmente mortal (Paton y col., 1996; Afset y col., 2003; Rivas y col., 2010). Las cepas EPEC son causales de una variedad de cuadros que incluyen desde presentaciones subclínicas hasta cuadros fatales (Torres, 2017). En Argentina se han recuperado cepas EPEC de los niños con diarrea (Lozer y Souza, 2013; Rivas y col., 2010; Trabulsi y col., 2002). Se ha reportado que las infecciones por EPEC constituyen la segunda causa de muerte en niños menores a 5 años y son responsables de 1 – 5 millones de muertes de niños por año (WHO, 2016). Además, representan una de las principales causas de la diarrea, especialmente en niños de países en desarrollo (Nataro y Kaper, 1998; Paton y col., 1996).

La vía de infección de estos patógenos es la ruta fecal-oral la cual no se limita al hogar o al consumo de alimentos y agua contaminados, sino también a áreas de juego como areneros contaminados por animales que pese a las restricciones de ingreso logran acceder.

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la persistencia de STEC y EPEC en una matriz de arena sometida a sequedad y sus posibles modificaciones en la virulencia; y evaluar la contaminación de areneros por coliformes, STEC y EPEC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Determinación de la persistencia de STEC y EPEC en una matriz sometida a sequedad.

Para los ensayos se recolectó arena de un arenero en Ciudad Autónoma de Buenos Aires. La cual fue tamizada previo a su utilización.

Se colocaron 10 g de la arena en recipientes de vidrio de tapa cribada con filtro. Los recipientes con el sustrato fueron esterilizados mediante autoclavado (121C° 20 min). A fin de establecer la condición de sequedad en la matriz, diariamente los recipientes fueron pesados y se determinó como sequedad la obtención de un peso constante en 3 pesadas consecutivas.

La inoculación con las cepas a evaluar se realizó en arena seca. Se generaron suspensiones equivalentes a 1 McFarland en H_2Odd estéril para cada estudio. Se realizó la inoculación experimental de la matriz con 10 ml de suspensión bacteriana en una proporción 1:1 (P:V), cantidad suficiente para asegurar la dispersión del inóculo en la matriz. Para facilitar la acción del calor de la estufa en forma homogénea se utilizaron frascos tipo Falcon de 45 ml con tapa cribada y filtro. Se utilizaron las cepas STEC pertenecientes a los serotipos O157:H7 (2 cepas: EDL933 y EDL933Δ*stx*$_1$) y O145:NM (1 cepa), dos cepas EPEC atípicas y *E. coli* NCTC12900 como control negativo. La dosis del inóculo se estableció mediante cuenta viable.

La mezcla arena:suspensión bacteriana fue evaluada diariamente. Se determinó la deshidratación de la matriz mediante pesado en forma diaria, bajo el criterio previamente expresado. Los ensayos se mantuvieron en ambiente controlado a 37 ºC. El estudio de cada cepa se realizó por triplicado.

A fin de determinar la persistencia de las cepas en estudio se evaluó la curva de muerte y la viabilidad de los microorganismos.

1.1 Determinación de curva de muerte.

Una vez inoculada la arena, diariamente se tomó una alícuota de 2 g de la arena inoculada y se suspendió en 10 ml de solución fisiológica (SF). Se realizó cuenta viable con siembra en agar Mac Conkey (AMC).

1.2 Determinación de viabilidad.

Diariamente se evaluó la viabilidad de las cepas tomando una alícuota de la matriz, suspendiéndola en SF (2 g arena: 10 ml de SF) y sembrando 0,1 ml por diseminación en AMC con posterior cultivo a 37 °C ON, observándose el estadio de viable cultivable (VC). A partir del día en que no se observó crecimiento en AMC la 200 µl de la suspensión (2:10 p/v) se sembraron en caldo de cultivo y fueron incubados 37°C ON a fin de resucitar a la cepa. Se evaluó desarrollo por turbidez y en caso de que lo hubiese se consideró a la cepa en estadio de viable no cultivable (VNC) (Xu y col, 1982). Los caldos utilizados para recuperar del estrés a las células VNC fueron caldo tripteína soja (CTS), caldo Mac Conkey (CMC), agua de peptona (H_2Op) y caldo glucosado (RMVP).

La duración del estado de VNC fue evaluada en el tiempo con la misma metodología descripta, mediante ensayos diarios de alícuotas a los medios de recuperación.

A partir de los caldos con turbidez, donde se recuperó la viabilidad de las cepas VNC, se realizó un repique a un medio sólido, observación microscópica con tinción de Gram y se analizó por bacteriología clásica con el fin de determinar si los microorganismos VNC resucitados modificaban su morfología, afinidad tintorial o alguna vía metabólica. La identidad del cultivo fue verificada mediante PCR del gen *uid*A y bacteriología clásica.

2. Evaluación genotípica de modificaciones en la virulencia en cepas sometidas a estrés por desecación.

En cada ensayo se evaluó la presencia de genes de virulencia, durante la curva de muerte y en el estadio de VNC. Dependiendo del perfil genotípico de la cepa en estudio se evaluaron los genes que codifican para la toxina Shiga 1 y 2 (*stx*$_1$ y *stx*$_2$) y para la intimina (*eae*).

3. Determinación de coliformes, STEC y EPEC en areneros de jardines de infantes de la ciudad de Tandil.

Se realizó la evaluación de areneros de los jardines de infantes de la ciudad Tandil, provincia de Buenos Aires. Se muestrearon 12 areneros. Para cada uno se tomaron 6 muestras de 200g: en 2 puntos de muestreo (centro y periferia) y 3 estratos i-muestra de la superficie, ii- muestra a 5 cm de profundidad y iii- muestra a 15 cm de profundidad.

Se realizó un pre-cultivo de arena en CTS. La determinación de coliformes fue mediante siembra en CMC con campana de Durham, para todas las muestras y todos los estratos en forma independiente. La detección de STEC y EPEC mediante PCR de los genes *stx*1/*stx*2/*rfb*O157/*eae*.

RESULTADOS

1. Determinación de la persistencia de STEC y EPEC en una matriz sometida a sequedad.

1.1 Determinación de la curva de muerte.

En el análisis de las curvas de muerte de las cepas en estudio se observó un descenso abrupto de la cantidad de microorganismos entre los días 2 y 4 coincidiendo con la desecación gradual de la matriz. Posteriormente los resultados son variables según la cepa en estudio.

Los gráficos de la curva de muerte para cada microorganismo en estudio se observan a continuación.

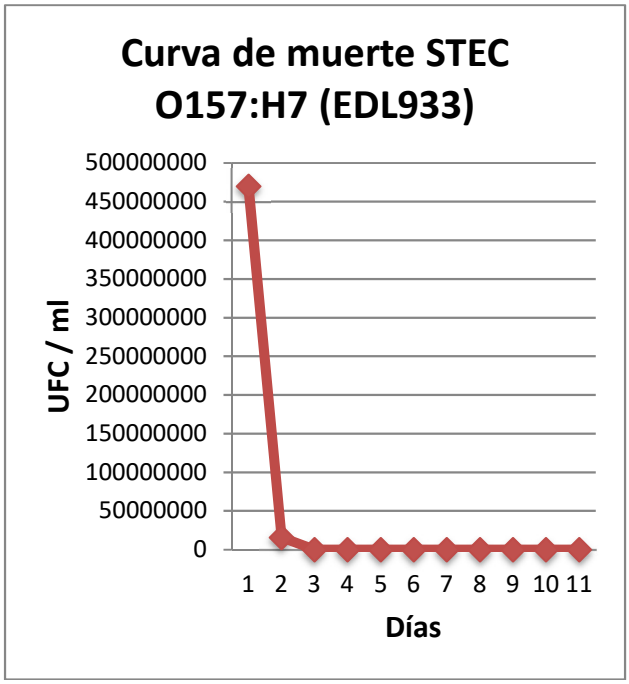


Fig. 1. Curva de muerte del STEC O157:H7 (EDL933), entre los días 7 y 11 la cantidad de bacterias se mantiene por debajo de las 10 UFC/ml. Luego la cepa muere.

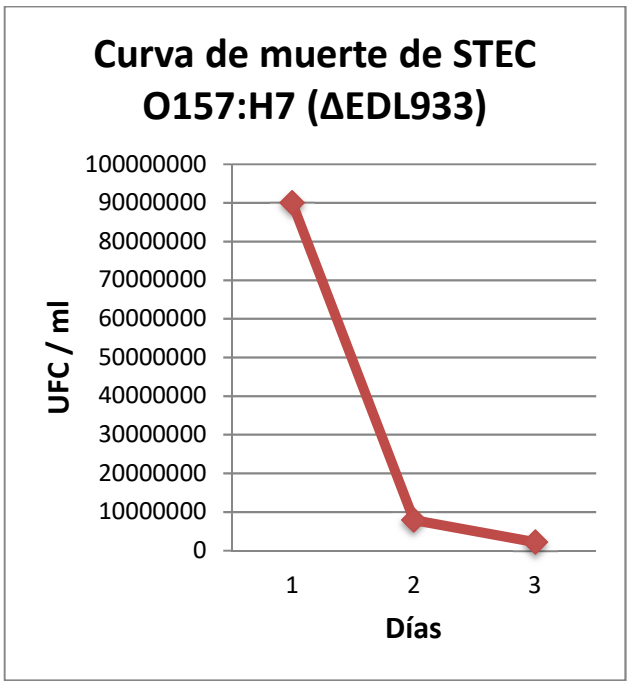


Fig. 2. Curva de muerte de ΔEDL933, la misma muestra la presencia de bacterias viables cultivables hasta el día 3 pos-inoculación. Luego la cepa muere.

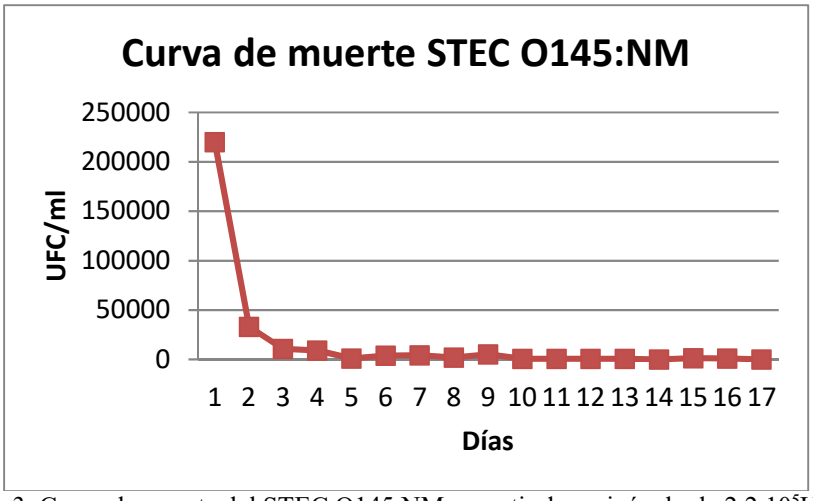


Fig. 3. Curva de muerte del STEC O145:NM, a partir de un inóculo de $2{,}2.10^5$UFC/ml.. Posteriormente permanece como VNC hasta el día 44 pos-inoculación.

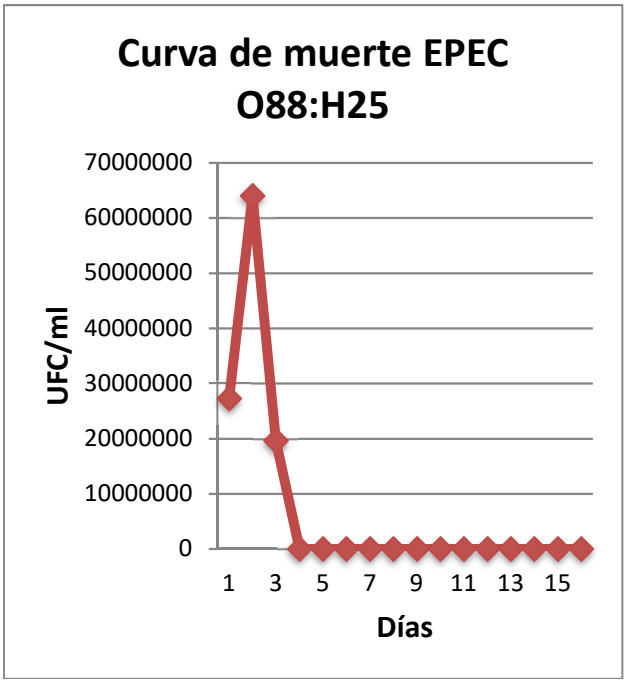


Fig. 4. Curva de muerte EPEC O88:H25, a partir del día 9 se hace más difícil la detección del patógeno, se observan cuentas viables por debajo de las 100 UFC/ml hasta el día 16. Luego la bacteria permanece 2 días más como VNC.

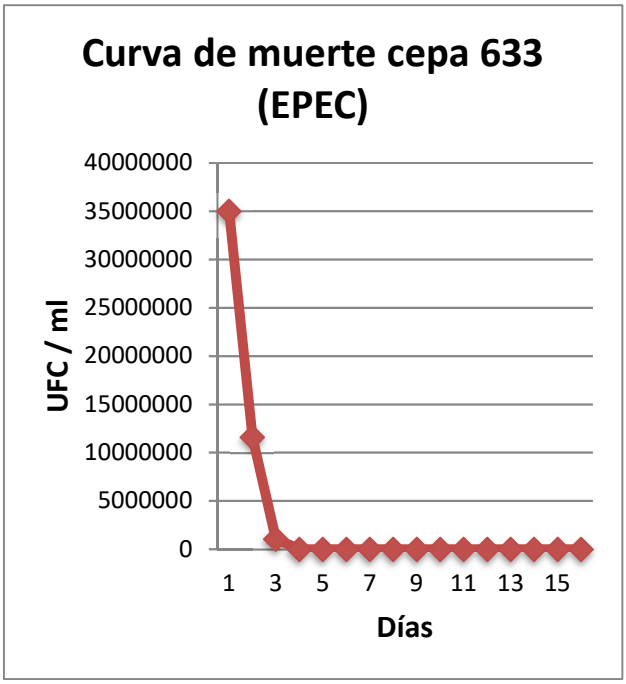


Fig. 5. Curva de muerte de la cepa 633 (EPEC), a partir del día 7 el patógeno se encuentra por debajo de las 10 UFC/ml, observándose el estadio VC hasta el día 16.

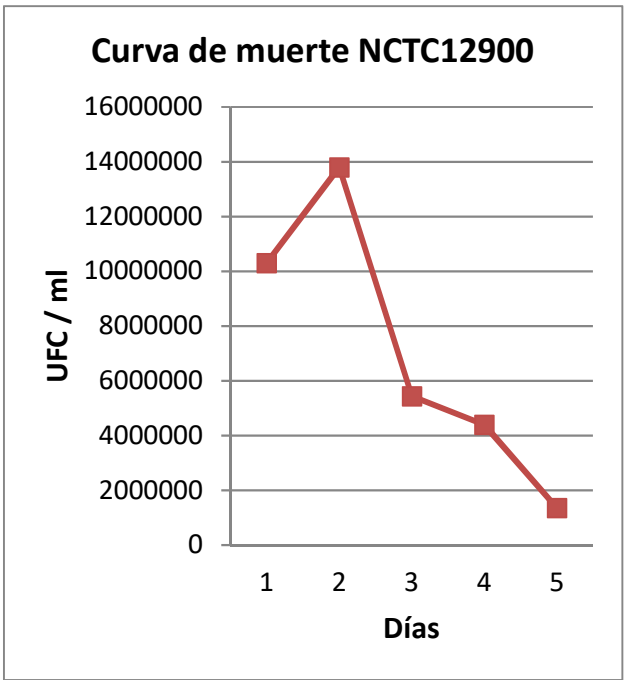


Fig. 6. Curva de muerte del control negativo NCTC12900, la misma muestra la presencia de bacterias viables cultivables hasta el día 5 pos-inoculación. Luego la cepa permanece como VNC hasta el día 41 pos-inoculación.

1.2 Determinación de la viabilidad.

En todos los casos la sequedad de la matriz se estableció en los 3 días pos-inoculación para el sistema.

En el serotipo O157:H7 (cepa EDL933, *stx*$_1$+/*stx*$_2$+/*eae*+) no se observó viabilidad más allá del día 11 pos-inoculación. No se detectó el estado VNC.

En la cepa EDL933Δ*stx*1 (serotipo O157:H7 con un perfil de virulencia *stx*$_1$-/*stx*$_2$+/*eae*+) no se observó viabilidad más allá del día 3, coincidiendo esto con la sequedad de la matriz. No se detectó el estado VNC.

El serotipo O145:NM (*stx*$_1$-/*stx*$_2$+/*eae*+) presentó una curva de muerte hasta el día 17 y persistió hasta el día 44 pos-inoculación como VNC en la matriz en estudio.

Las cepas EPEC (ambas *eae*+/*bfp*-) estudiadas mostraron un comportamiento similar en cuanto a su viabilidad. Para la cepa identificada como #R27 en el laboratorio (serotipo O88:H25) se pudo realizar cuenta viable hasta el día 16 pos-inoculación, posteriormente se recuperaron formas VNC los 2 días siguientes, luego la cepa murió. En la cepa #633 (pendiente de serotipificación) no se observó viabilidad más allá del día 16 pos-inoculación y no se detectó el estado VNC.

En el control negativo NCTC 12900 (*stx*$_1$-/*stx*$_2$-/*eae*-) se pudo realizar cuenta viable hasta el día 5 pos-inoculación, posteriormente se verificó la presencia de bacterias VNC hasta el día 41 pos-inoculación.

El comportamiento de las cepas sometidas a estrés por desecación puede observarse en la tabla1.

Tabla 1. Comportamiento de las cepas bajo estudio en una matriz de arena sometida a desecación a 37°C

ID	Serotipo	Patovar	Duración de estadio VC	Duración de estadio VNC
EDL933	O157:H7	STEC	11 d	No se observó
ΔEDL933	O157:H7	STEC	3 d	No se observó
GIV	O145:NM	STEC	17 d	44 d
#633	O88:H25	EPEC	16 d	2 d
#R27	----	EPEC	16 d	No se observó
NCTC12900	O157:H7	Control negativo	5 d	41 d

Al evaluar 4 medios diferentes para recuperar las bacterias del estrés de las condiciones de sequedad y restablecer las condiciones para células en estado de VNC, se observaron mejores resultados al utilizar CTS y H_2O_p.

No se observaron cambios en las rutas metabólicas durante los ensayos en cepas cultivables como VNC a partir de las bioquímicas realizadas.

2. Evaluación genotípica de modificaciones en la virulencia en cepas sometidas a estrés por desecación.

En el análisis molecular de factores de virulencia tanto las cepas STEC como la EPEC estudiadas presentaron los genes de virulencia que codifican para toxina Shiga 1, 2 e intimina durante la curva de muerte, incluso en el estadio de VNC.

3. Determinación de coliformes, STEC y EPEC en areneros de jardines de infantes de la ciudad de Tandil.

En todas las muestras se observó fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas por lo que se determinó la presencia de coliformes.

Un total de 4 muestras resultaron positivas a la presencia del gen *eae.* Una muestra resultó positiva a la presencia del gen *rfb*O157, siendo negativa para la presencia de los genes que codifican para las toxinas Shiga 1 y 2.

En ningún caso se logró el aislamiento de los patovares bajo estudio.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo estudia la persistencia de cepas STEC y EPEC en una matriz de arena sometida a condiciones ambientales estresantes como calor, desecación y falta de nutrientes. En la evaluación de cepas en dicha matriz, sometidas a 37 °C en forma constante, se observaron diferencias.

La cepa EDL933 (serotipo O157:H7, *stx*$_1$+/*stx*$_2$+/*eae*+) permanece viable por 11 días a bajas dosis, a diferencia de la cepa ΔEDL933 que no persiste más allá de los tres días, coincidiendo su muerte con el estado de sequedad de la matriz. Este resultado difiere de Ma y col. (2011) quien observa persistencias de O157:H7 mayores en suelos arenosos (32 días) y similares en cepas O157:H7 *wild type* y sus mutantes, estableciendo que la presencia de toxina Shiga o intimina no juegan un rol de importancia en la persistencia del patógeno en diferentes suelos, entre ellos el arenoso.

Por su parte la cepa evaluada perteneciente al serotipo O145:NM presenta una curva de muerte que se extiende hasta el día 18 observándose bajas dosis del patógeno. Si bien los resultados son variables la presencia de STEC en la arena, incluso en bajas dosis, cobra importancia debido a que la dosis infectiva del patógeno es muy baja (<100 bacterias por gramo).

Asimismo, se ha observado la persistencia de las cepas EPEC evaluadas en el presente trabajo se extiende a bajas dosis por más de 2 semanas. La dosis infectiva del patógeno ha sido alta en adultos voluntarios (entre 10^8 y 10^{10} bacterias), sin embargo la dosis infectiva que causa diarrea en niños aún es desconocida (Scaletsky y Fagundes-Neto, 2016).

La cepa STEC O145:NM persiste hasta el día 44 post-inoculación como VNC. Esta persistencia se observó también en la cepa control negativo (NCTC 12900) así como también se observó el estado de VNC en la cepa EPEC O88:H25 por dos días. Esta situación difiere de aquella observada en O157:H7 donde no se observó el estado de VNC. Zhao y col. (2013) esgrimen que O157:H7 puede volverse VNC al ser sometido a alta presión de CO_2 (Zhao y col., 2013). Las bacterias VNC constituyen una subpoblación bacteriana que surge frente a condiciones de estrés (Arana y col., 2018). Si bien no está claro si este estadio constituye una forma de resistencia a condiciones adversas o un estadio intermedio previo a la muerte (Ohtomo y Saito, 2001) se ha observado en más de 60 especies bacterianas (Ding y col., 2017).

La evaluación de medios para resucitar al patógeno mostró mejores resultados con pre-enriquecimientos con CTS o con H2Op a 37 °C 24 h. El CTS se compone de tripteína, peptona de soja, cloruro de sodio, fosfato dipotásico y glucosa, mientras que el H2Op está compuesto de peptona de carne y cloruro de sodio. Los medios RMVP y CMC poseen

pluripeptona, glucosa y fosfato dipotásico el primero; y peptona de gelatina, lactosa, púrpura de bromocresol, bilis de buey el segundo. Zhao y col. (2013) también lograron resucitar bacterias VNC de *E. coli* O157:H7 utilizando CTS. Asimismo, se ha reportado que el piruvato de sodio, los aminoácidos, una sustancia denominada autoinductor enterobacterial termo estable, el sobrenadante de células en crecimiento y el aumento de la temperatura constituyen estímulos para resucitar bacterias VNC (Li y col., 2015; Zhang y col., 2015; Asakura y col., 2008; Pinto y col., 2011; Reissbrodt y col., 2002; Ohtomo y Saito, 2001).

En la evaluación de las pruebas bioquímicas clásicas de *E. coli* no se observaron diferencias en las rutas metabólicas evaluadas entre bacterias VC y bacterias VNC resucitadas, esto coincide con otros autores que esgrimen que las bacterias VNC mantienen su actividad metabólica (Oliver, 2005; Fakruddin y col., 2013; Oliver, 2010; Pinto y col., 2013).

Al evaluar la virulencia de cepas en estudio se observó que las mismas conservaban sus genes de virulencia incluso durante el estadio de VNC, siendo necesaria la evaluación fenotípica de las cepas sometidas a estrés. Oliver (2005) observó que las células VNC expresan sus toxinas. Asimismo, Liu y col. (2010) detectaron mediante RT-PCR una mayor expresión de stx_1 y stx_2 en el estadio de VNC comparado con el estadio cultivable. Esto alerta la situación de cepas tales como O145:NM con un largo período en el estado VNC, las que pueden infectar los niños en bajas dosis produciendo cuadros clínicos de gravedad.

En el análisis de areneros de jardines de infantes se detectó la presencia de coliformes en todos los casos, y la presencia de los genes *eae* (n=4) y *rfb*O157 (n=1). La presencia de *E. coli* comensal se ha evaluado previamente en arena principalmente en playas (Byappanahalli y col., 2006; Vogel y col., 2016; Ishii y col., 2007; Hartz y col., 2008). Asimismo, la presencia de *E. coli* patógena portadora de genes *eae*, *bfp*, *iuc*D, *pap*IG, *sfa* y *hly* ha sido detectada en arena de parque en Brasil (Fernández y col., 2013).

Los resultados obtenidos permiten considerar el riesgo que constituye la arena seca como fuente de infección de STEC, particularmente para los niños quienes desarrollan actividades lúdicas en areneros. Siendo necesario considerar el ambiente, en particular los areneros, en la dinámica epidemiológica de las infecciones por STEC.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an endemic pathogen indicated as the main etiology of hemolytic uremic syndrome (HUS). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) another pathovar that impacts public health and causes diarrhea, leading to a range of symptoms in children from mild to severe and in some cases, are fatal. The aim of this work was to study the persistence of STEC and EPEC strains in dry sand.

Suspensions of STEC and EPEC strains were inoculated in containers with sterile sand and kept at 37°C. The STEC strains belonged to the serotypes O157:H7 (2 strains: EDL933 and EDL933Δstx1) and O145:NM (1 strain), two atypical EPEC strains, and *E. coli* NCTC12900 as negative control were used. Death curve was performed and viability was determined. The metabolic pathway and the virulence of the strains were evaluated by PCR.

Besides, the presence of coliforms, STEC, and EPEC was evaluated in 6 sample points from sandboxes of 12 kindergartens in Tandil city.

The results showed differences between strains. The death curves did not extend beyond 17 days. Some strains such as STEC O145:NM, with a high impact on health, presented non-cultivable viable forms in which can remain in the matrix for 44 days postinoculation. Throughout the study, no variations were observed in the metabolic pathways of the pathogens. The presence of virulence factors (genes that code for Shiga toxin and intimin) remained constant in the study. In the evaluation of sandboxes, the presence of coliforms was determined in all the samples analyzed, also the presence of the genes *eae* (n = 4) and *rfb*O157 (n = 1) was detected.

The results allow us to consider the risk posed by dry sand as a source of STEC and EPEC infection, particularly for children who carry out recreational activities in sandboxes.

BIBLIOGRAFÍA

Afset, J.E.; Berg, K.; Bevanger, L. (2003) Hight prevalence of atypical enteropathogenic Escherichia coli in Norwegian children with diarrhea. J. Med Microbiol, 52:1015-19.

Arana, I.; Seco, C.; Epelde, K.; Muela, A.; Fernández-Astorga, A.; Barcina, I. (2004) Relationship between E. coli cells and the surrounding médium during survival processes. Antonie van Leeuwenhoek, 86: 189-99.

Asakura, H.; Kawamoto, K.; Haishima, Y.; Igimi, S.; Yamamoto, S.; Makino, S. (2008) Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stess response in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 corresponds to the viable but nonculturable state. Res Microbiol, 159: 709-17.

Bergey, D.H.; Holt, J.G. (1994) Bergey´s manual of determinative bacteriology. Edición: 9, p 787.

Boletín Integrado de Vigilancia N481 – SE02 (2020). Consultado 28/07/2020 https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_481_edicion_ampliada.pdf.

Byappanahalli, M.N.; Whitman, R.L.; Shively, D.A.; Ting, E.; Tseng, C.C.; Nevers, M.B. (2006) Seasonal persistence and population characteristics of Escherichia coli and enterococci in deep backshore sand of two freshwater beaches. Journal of water and Health, 04.3: 313-20.

Ding, T.; Suo, Y.; Xiang, Q.; Zhao, X.; Chen, S.; Ye, X.; Liu, D. (2017) Significance of viable but nonculturable Escherichia coli: induction, detection, and control. J Microbiol Biotechnol, 27(3):417-28.

Fakruddin, M.; Mannan, KSB; Andrews, S. (2013) Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. ISRN Microbiol, 2013: 1-6.

Fernandes, M.C.; Takai, S.; Leite, D.S.; Pinto, J.P.A.N; Brandao; P.E.; Santarem, V.A.; Listoni, F.J.P.; Da Silva, A.P.; Ribeiro, M.G. (2013) Identification of pathogens and virulence profile of Rhodococcus equi and Escherichia coli strains obtained from sand and parks. Brazilian J. of Microbiology, 44(2): 485-91.

Hartz, A.; Cuvelier, M.; Nowosielsky, K. (2008) Survival potential of Escherichia coli and enterococci in subtropical beach sand: implications of water quality managers. J. Environ Qual, 37:898-905.

Ishii, S.; Hansen, D.L.; Hicks, R.E.; Sadowsky, M.J. (2007) Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of Escherichia coli in Lake Superior. Environ Sci Technol, 41(7): 2203-9.

Li, L.; Mendis, N.; Trigui, N.; Oliver, J.D., Faucher, S.P. (2015) The importance of viable but non-cultivable state in human bacterial pathogens. Front Microbiol. 5:258.

Liu, Y.; Wang, C.; Tyrrell, G.; Li, X.F. (2010) Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable Escherichia coli O157:H7. Water Res 44: 711-8.

Lozer, D.; Souza, T. (2013) Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. BMC Infect Dis, 13: 418.

Ma, J.; Ibekwe, A.M.; Yi, X.; Wang, H.; Yamazaki, A.; Crowley, D.E.; Yang Ch. (2011) Persistence of Escherichia coli, O157:H7 and its mutants in soils. PlosOne, 8(6): e23191.

Multilocus Sequence Typing database system for pathogenic E. coli (EcMLST). www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/scheme. Consultado el 01/09/2019.

Nataro, J.P.; Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev, 11: 142-201.

Ohtomo, R.; Saito, M. (2001) Increase in the culturable cell numbre of Escherichia coli during recovery from saline stress: posible implication for resuscitation from the VBNC state. Microb Ecol, 42: 208-14.

Oliver, JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. J Microbiol, 43: 93-100.

Oliver, JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev, 34: 415-25.

Paton, A.W.; Ratcliff, R.M.; Doyle, R.M.; Seymour-Mourray, J.; Davos, D.; Lanser, J.A; Paton, J.C. (1996) Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic síndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing Escherichia coli. Journal of Clinical Microbiology, 34(7): 1622-7.

Pinto, D.; Almeida, V.; Almeida S.M.; Chambel, L. (2011) Resucitation of Escherichia coli VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. J Appl Microbiol, 110: 1601-11.

Pinto, D; Santos, M.A.; Chambel, L. (2013) Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. Crit Rev Microbiol, 41:61-76.

Reissbrodt, R.; Rienaecker, I.; Romanova, JM; Freestone, PPE; Haigh, RD; Lyte, M.; Tschäpe; Williams, P.H. (2002) Resuscitation of Salmonella enterica serovar Typhimurium and enterohemorrhagic Escherichia coli from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. Appl Environ Microbiol, 68: 4788-94.

Scaletsky, I.C.; Fagundes-Neto, U. (2016) Typical enteropathogenic Escherichia coli, p. 59-76. En Torres, A.G. (Ed) Escherichia coli in the Americas. Springer International Publishing AG, Switzerland.

Trabulsi, L.R.; Keller, R.; Gomes T.A.T. (2002) Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. Emerg Infect Dis 8:508-13.

Torres A. (2017) Escherichia coli diseases in Latin America—a 'One Health' multidisciplinary approach. Pathogens and Disease, 75. ftx012, 2017.

Rivas, M.; Padola, N.L-; Lucchesi, P.M.A.; Masana, M. (2010) Diarrheagenic Escherichia coli in Argentina. En Torres, A.G. (Ed) Pathogenic Escherichia coli in Latin America. Bentham Science Publishers, USA. Cap 10: 142-161.

Vogel, L.J.; O´Carroll, D.M.; Edge, T.A.; Robinson, C.E. (2016) Release of Escherichia coli form foreshore sand and pore water during intensified wave conditions at a recreational beach. Environ Sci Technol, 50(11): 5676-84.

World Health Organization, WHO (2016) En http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/es/ Consultado el 27/03/2017.

Xu, H.S.; Robert, N.; Singleton, F.L.; Attwel, R.W.; Grimes, D.J.; Colwell, R.R. (1982) Survival and viability of non-culturable Escherichia coli and Vibrio cholera in the estuarine and marine environment. Microbiol Ecology, 8: 313 – 23. Ma, J.; Ibekwe, A.M.; Yi, X.; Wang, H.; Yamazaki, A.; Crowley, D.E.; Yang C.(2011) Persistence of Escherichia coli O157:H7 and its mutants in soilds. Plos One, 6(8): 1-9. e23191

Zang, S; Ye, C.; Lin, H.; Lv, L.; Yu, X. (2015) UV disinfection induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Environ Sci Technol, 49: 393-402.

Zhao, F.; Bi, X.; Hao, Y.; Liao, X. (2013) Induction of viable but nonculturable Escherichia coli O157:H7 by High Pressure Co2 and its characteristics. Plos One, 8(4):1-9. e62388.

ESTUDIO PRELIMINAR DE ADAPTACIÓN TRANSCULTURAL DE LA ESCALA DE EVALUACIÓN DEL DESARROLLO INFANTIL BAYLEY III EN BUENOS AIRES, ARGENTINA

Vivian Bokser

Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

1 - ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA

1.1 Marco teórico.

Existe consenso internacional sobre la importancia de incluir la valoración del neurodesarrollo en la promoción de la salud y la atención pediátrica [1-3]. Este componente y la supervisión del crecimiento constituyen los ejes en los cuales se estructuran los conocimientos de salud del niño, tanto en la atención individual como en la evaluación de grupos de poblaciones de alto riesgo. [3] Cuanto más oportuno sea el diagnóstico de trastornos en el neurodesarrollo y más adecuada y oportuna sea la intervención, mejor será la calidad de vida, junto al máximo despliegue de las potencialidades y menor el impacto del déficit en la vida futura. [3].

1.2 ¿Qué entendemos por neurodesarrollo?

El neurodesarrollo infantil comienza desde la vida intrauterina, envuelve aspectos del crecimiento físico y la maduración neurológica. Es un proceso de cambios mediante el cual el niño alcanza mayor complejidad en sus movimientos, pensamientos, emociones y relaciones con los otros. El resultado es un niño competente para responder a sus necesidades y a las de su medio, considerando su contexto de vida. [1]

1.3 ¿Cómo vigilar y cuándo detectar trastornos del neurodesarrollo?

Los primeros años de vida son fundamentales en el porvenir de los niños, requieren de cuidados y afectos del entorno que le brinden las oportunidades para el progreso adecuado de su desarrollo. Estos primeros años se pueden caracterizar como un periodo crítico de la vida, ya que las funciones que no se ejercen en la edad correspondiente, se pierden y no permiten una buena integración de otras que aparecen posteriormente en el curso del desarrollo. [3]

El neurodesarrollo humano desde el momento de la fecundación hasta la organización de un individuo maduro es la consecuencia de un conjunto de procesos genéticamente regulados que ocurren en un estricto orden cronológico y espacial, en respuesta al intercambio con el medio. [4] Esta importante interacción con el ambiente puede evidenciarse a través de uno de los conceptos más relevantes en la evolución del neurodesarrollo: la “neuroplasticidad”. La Organización Mundial de la Salud define el término *neuroplasticidad* como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas ambientales. La capacidad del cerebro para adaptarse y compensar los efectos

de la lesión, aunque sólo sea de forma parcial, es mayor en los primeros años de vida. Es importante remarcar también, que en este período ocurre un importante crecimiento neuronal, glial y de la mielina, junto con la eliminación selectiva sináptica característica de esta etapa crítica. [5]

1.4 Prevalencia de trastornos del neurodesarrollo.

La Organización Panamericana de la Salud estima que, en cualquier país, cerca del 10 % de la población presenta retrasos significativos en su neurodesarrollo. [1] En Estados Unidos se estima que entre un 1 y un 3% de los niños menores de 5 años presentan retraso del desarrollo; y que el 5-10% de la población pediátrica sufre alguna "discapacidad del desarrollo". Si añadimos los problemas de comportamiento, resulta que el 12-16% de los niños padece problemas de desarrollo o de conducta. [6] Sobre los retrasos permanentes del desarrollo motor, como la parálisis cerebral, esta posee una prevalencia de 3.3 / 1000 niños. Entre los trastornos del espectro autista, se estima una prevalencia de 1 cada 88 niños. [7]

En nuestro país, la implementación de un programa de pesquisa (PRUNAPE) en el primer nivel de atención (San Isidro) por Lejarraga y col. demostró una tasa de fracaso del test de pesquisa de alteraciones del neurodesarrollo del 20% [8]. En Brasil, Hapern y col. sobre una muestra de 1363 niños encontró sospecha de retraso en el 34% de los pacientes a los que se les administró el Test de Denver. [1, 8]

Los recién nacidos prematuros, así como otras poblaciones de recién nacidos de alto riesgo, tienen una sobrevida y morbilidad muy diferente, mayor riesgo de discapacidad neurológica [9] y anormalidades en el neurodesarrollo, problemas de motricidad fina y gruesa, déficit atencionales, trastornos cognitivos, problemas de conducta y emocionales que pueden interferir en las actividades académicas, no solo en la edad escolar, sino en su adultez, lo cual explica la organización y la sistematización de programas de seguimiento que promueven la detección temprana de trastornos del neurodesarrollo en esta población . [3, 5, 10, 11, 12]

Según los datos extraídos de la Dirección de Estadísticas e Información en Salud [13], en el año 2015, sobre un total de 770.040 nacidos vivos, alrededor del 8 % nace antes de las 37 semanas de gestación (64.100). A esta población vulnerable debe agregarse los recién nacidos de término con malformaciones congénitas diversas y recién nacidos quirúrgicos neonatales. Es prioritario considerar que, entre el 5 al 6 % del total de nacidos vivos (aproximadamente 40.000) serán egresados de una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. [13] Si bien los datos son variados, en algunas cohortes de seguimiento de recién nacidos de alto riesgo, cerca de la mitad tiene algún grado de alteración de su neurodesarrollo, incluso en la edad de ingreso escolar. [14-16]

Por lo tanto, puede deducirse que estamos ante un problema de salud infantil verdaderamente prevalente.

¿Cómo evaluar y detectar desviaciones o trastornos del neurodesarrollo?

Los instrumentos de evaluación se clasifican en: Instrumentos de Supervisión, Test de Screening o tamizaje y Test Diagnósticos. Los mismos evalúan las diferentes áreas del desarrollo: social, lenguaje, motor, coordinación. [2, 17]
Estos instrumentos, diseñados para identificar problemas de desarrollo en diferentes poblaciones, requieren ser sometidos a pruebas de adaptación y validación antes de su implementación.

La adaptación consiste en la adecuación de un test a contextos lingüísticos y culturales diferentes a aquellos en que fueron construidos. [18]

1.5 Proceso de adaptación.

Los tests no son automáticamente utilizables, deben de adaptarse/construirse cuidadosamente, en función de las diferencias interculturales entre el idioma/cultura originaria y aquéllos en los que se pretende utilizar. [19]

El punto clave es poder hacer una adaptación según normas locales, pero conservando la estructura fundamental del instrumento, que pueda hacer posible una futura comparación internacional del test y sus resultados. [20]

Actualmente se reconoce que la adaptación de un Test es un proceso mucho más complejo que la mera traducción de ese test en un idioma diferente. Una adaptación implica considerar no sólo las palabras utilizadas al traducir la prueba sino también las variables culturales involucradas. [20]

Van de Vijver y Leung (1997) establecieron tres niveles de adaptación de las pruebas psicológicas. El primero corresponde a la simple y llana *traducción* de un test de un idioma a otro. Desafortunadamente, es el método más utilizado en todo el mundo. Como se indica anteriormente la sola traducción de una prueba no nos indica ningún nivel de equivalencia entre ambas versiones de la misma. La segunda alternativa es la *adaptación*. En este caso a la traducción se agrega la transformación, adición o substracción de algunos ítems de la escala original. Como se explicó, algunos ítems pueden cambiar su significado a través de las culturas y, por lo tanto, necesitan modificaciones o ser eliminados. Así como otros ítems, que no existen en la versión original del test pueden representar mejor al constructo en la población en la cual se administra la nueva versión. [20]

Finalmente, la opción *ensamble*. En este caso el instrumento original ha sido modificado tan profundamente que prácticamente se ha transformado en un nuevo instrumento original con los nuevos elementos. Esto ocurre cuando muchos de los ítems del test original son evidentemente inadecuados para representar el constructo a medir. [20]

2 - ORIGINALIDAD DE LA PROPUESTA. UTILIZACIÓN DE TEST DE EVALUACIÓN DEL NEURODESARROLLO EN ARGENTINA: SU CONFIABILIDAD Y VALIDEZ

En nuestro país existen diversas herramientas de evaluación del neurodesarrollo. La Prueba Nacional de Pesquisa (PRUNAPE) es una herramienta eficaz para la detección de trastornos inaparentes del desarrollo en niños menores de 6 años; está debidamente validada, es recomendada por el Comité de Pediatría Ambulatoria de la Sociedad Argentina de Pediatría y ha sido ampliamente utilizada en diversos ámbitos. [21] Existen pruebas más económicas y cortas dirigidas a padres o tutores con un método más sencillo, que preselecciona a los niños con mayor probabilidad de no pasar la PRUNAPE: cuestionario pre-PRUNAPE. Esta es una herramienta costo-eficaz en el proceso de detección de los niños candidatos a esa prueba y, ulteriormente, a diagnósticos e intervenciones específicas. [21]

La Escala Argentina de Inteligencia Sensorio-motriz (EAIS) es el primer instrumento creado en Argentina para la evaluación del desarrollo cognitivo en bebés de 6 a 30 meses. Esta prueba fue elaborada en el 2002 partiendo de una serie de pruebas

estandarizadas basadas en las observaciones experimentales de Piaget. Esta herramienta contempla el análisis de los mecanismos intelectuales alcanzados por los bebés, con la construcción de baremos para la población argentina. [22]

Otra de las herramientas utilizadas es el Instrumento de Observación del Desarrollo Infantil para niños y niñas menores de 4 años (IODI), propuesto por el Ministerio de Salud de la Nación como instrumento de supervisión en las niñas y niños menores de 4 años, así como contribuir a la detección oportuna de situaciones de riesgo y signos de alarma. [23]

Junto a estas últimas herramientas nacionales de innegable aporte a la detección y vigilancia de las desviaciones del neurodesarrollo en nuestro país, es necesario que sean complementados por una instancia diagnóstica, con un instrumento que posea una validez adecuada a las características culturales locales.

La Escala de evaluación del Neurodesarrollo Infantil y Conductas adaptativas, Bayley III (BSID III) representa una de las herramientas de evaluación más utilizadas mundialmente, incluso en población de alto riesgo, como los recién nacidos prematuros. [24-25]. Es una prueba diagnóstica de origen estadounidense (Anexo I), que intenta confirmar y/ o caracterizar a una entidad diagnóstica a fin de efectuar una intervención oportuna, y ha sido utilizado ampliamente en muchas culturas, para investigación y seguimiento clínico, sin embargo existe evidencia que su utilización no sea adecuada en población no estadounidense. [24-25]

La prueba se encuentra disponible en idioma inglés y español, sin embargo, no cuenta con estudios de adaptación y validación en países de habla hispana en Latinoamérica, estando los estudios de validación y adaptación originales de la prueba circunscritos a la población estadounidense, Brasil, del Reino Unido, y diferentes regiones de Europa y Asia. [25-26-27]

La utilización del Test de Bayley según la normatización construida para la población americana (USA) [28], muchas veces puede no ser adecuada para las características locales de la población evaluada en los diferentes países. [26]

Torralba et al (1999) realizaron un estudio en la ciudad de Ushuaia con el objetivo de describir el desarrollo mental y motor en los primeros años de vida en una comunidad de características urbanas con adecuado acceso a la alimentación, cobertura de salud y su relación con el nivel socioeconómico y el grado de estimulación recibido. Aplicando el Test de Bayley se observaron algunas diferencias en las puntuaciones de estos niños en comparación con la muestra norteamericana donde la prueba fue construida. [29]

En el año 2005, Rodríguez M. y colaboradores, en la ciudad de Córdoba, han evaluado la consistencia interna y confiabilidad de la Escala Bayley III en una población menor de un año de vida. [29]

Se ha utilizado ampliamente la escala BSID III en nuestro país, pero no se ha completado un proceso formal de adaptación transcultural del instrumento.

Por todo lo expuesto anteriormente, se plantea la necesidad de realizar la adaptación del test BSID III como herramienta diagnóstica de trastornos del neurodesarrollo en la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires, Argentina.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Establecer los elementos necesarios para formular una versión preliminar de adaptación transcultural de la Escala Bayley III (BSID III), como prueba diagnóstica para identificar retraso en el neurodesarrollo en niños entre 1 a 24 meses de edad en la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires, Argentina.

3.2 Objetivos específicos.

3.2.1 Identificar patrones de desviación en la secuencia de los ítems/pautas de cada uno de los subtest que conforman la versión original del BSID III en la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires.

3.2.2 Seleccionar los puntos de comienzo para la administración de cada subtest que conforman la versión original del BSID III, en relación con el grupo etario, en la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires

4 - PACIENTES Y MÉTODOS

4.1 Diseño.

Transversal, observacional, de adaptación de test diagnóstico.

4.2 Métodos.

Escala de evaluación del Neurodesarrollo Infantil y Conductas adaptativas: Bayley III (BSID III).

El BSID III está compuesto por una sucesión de pautas madurativas (ítems) que van aumentando la complejidad a medida que se avanza en la edad cronológica. El orden de la secuencia de los ítems o pautas está determinado según la complejidad o dificultad de aprobación de los mismos. El punto de comienzo, la secuencia de los ítems y punto de finalización del Test están determinados por la capacidad del niño y son de gran importancia para la construcción del resultado final o puntaje del test. [26]

¿Cómo se determinan la secuencia de ítems y el punto de comienzo?

La elección del punto de comienzo está determinada por la proporción de niños que pasan positivamente el ítem. En un grupo de determinada edad, a medida que aumenta la complejidad de las pautas, la proporción de niños que aprueban positivamente irá decreciendo. Aquellos ítems que difieran más de 5% (en más o en menos) en la proporción de aprobación de la pauta precedente o siguiente en la secuencia establecida, es considerada una desviación del patrón. Este punto de corte de 5 % se basa en el criterio de la construcción del Test de Bayley, donde al menos el 95 % de los niños pertenecientes a ese grupo etario pasaban la prueba (secuencia) o aprobaban los tres primeros ítems luego del punto de comienzo (elección del punto de comienzo). [26]

El punto clave para la adaptación del Test es la búsqueda de patrones de desviación para construir la secuencia definitiva de los diferentes ítems, adecuada en una población local.

4.3 Pacientes y muestra.

4.3.1- Muestreo.

El estudio preliminar de la adaptación transcultural argentina debe incluir un muestreo poblacional representativo de todo el territorio argentino. Sin embargo, en este estudio preliminar, se seleccionó a la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y la Provincia de Buenos Aires como una primera etapa. Debe considerarse que estas dos regiones, representan el 44 % de la población menor de 4 años del territorio argentino. [13]

Para el reclutamiento de la población elegida fueron consideradas las características demográficas de la misma, como el nivel socioeconómico (NSE), representado en este caso por el sistema de cobertura de salud y la educación materna, según los datos extraídos de la Dirección de Estadísticas e Información en Salud (DEIS). [13]

Tabla I: Características socio-demográficas la CABA y Provincia de Buenos Aires, República Argentina, Año 2015.

	Área	**Proporción**
Nacidos vivos de madres sin instrucción o con bajo nivel de instrucción	CABA	1.3
	Gran Bs As	3.2
Población de 0 a 4 años, según jurisdicción	CABA	6
	Gran Bs As	38
	Resto del país	56
Pertenencia a sistemas de atención de salud (Total país)	Pública	58
	Privada/ obra social	42

Fuente: Dirección de Estadísticas e Información de Salud (DEIS). Estadísticas vitales. Información básica. Año 2015. Serie 5. N° 59.

4.3.1.1 Criterios de inclusión:

Pacientes sanos entre 16 días y 24 meses de edad sin retraso o trastorno del neurodesarrollo aparente, nacidos de 37 semanas o más de edad gestacional.

Definiciones operativas:

Pacientes sin retraso o trastorno del neurodesarrollo aparente cuando posee:

a) Evaluación neurológica normal: Paciente con ausencia de patología según los criterios del DSM-V **Y**

b) Tamizaje o pesquisa del Desarrollo: Los pacientes serán evaluados a través del cuestionario pre-PRUNAPE [(21)], si el niño no pasa el cuestionario, deberá suministrarse la PRUNAPE (en esta instancia debe PASAR la PRUNAPE) **Y**

c) Ausencia de déficit auditivo /visual, aislado y/o mixto.

La información requerida para los puntos (a) y (c) fueron obtenidos mediante una breve encuesta al médico pediatra de cabecera.

El punto (b) fue evaluado por el examinador, para luego administrar la prueba de BSDI III.

d) **Paciente sano**. Se consideró paciente sano ante la ausencia de alguna de las siguientes enfermedades crónicas o riesgos biológicos asociados:

   Enfermedad crónica asociada: Aquel niño cuya afección afecta su funcionamiento diario por más de 3 meses al año o requiere hospitalización por más de 1 mes al año o está en riesgo de padecer cualquiera de estas 2 condiciones. [(8)]

   Factores de riesgo biológico: Enfermedades que afecten el desarrollo: Síndromes genéticos asociados a trastornos del neurodesarrollo (Ejemplos: Síndrome de Down, de Williams, de X frágil, etc.). Enfermedad Metabólica asociada a trastornos del neurodesarrollo (Mucopolisacaridosis, Enfermedad de Menkes, etc.). Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Enfermedades Neurológicas (epilepsia, enfermedades neurocutáneas, tumores, malformaciones congénitas, secuelas de infecciones, meningitis, meningoencefalitis). Exposición a toxinas fetales (infecciones intrauterinas con serologías positivas, alcohol, radiación, cocaína, marihuana, anticonvulsivantes, diabetes no controlada, etc.). Bajo peso al nacer (peso nacer: < 2500g). Asfixia perinatal (Puntaje Apgar < 5 al minuto 5, líquido amniótico meconial, encefalopatía neonatal en los primeros días de vida). Meningitis neonatal. [(8)]

NOTA: Fue incluido en la muestra hasta un 15 % de población con riesgo de alteraciones del neurodesarrollo, motivado por alguna de las enfermedades crónicas o riesgos biológicos anteriormente definidos. De esta manera se intenta aumentar la representatividad de la muestra a la población local.

La información requerida para el punto (d) fue obtenida mediante una breve encuesta al médico pediatra de cabecera.

4.3.1.2- Criterios de exclusión:

Fueron excluidos aquellos niños o lactantes que presentaran en el día del examen enfermedades agudas que impidieron la correcta evaluación de su desarrollo, tales como síndromes febriles, otitis aguda, diarrea, infección respiratoria aguda, etcétera.

4.4 Proceso de Adaptación del test.

El proceso preliminar de adaptación se llevó a cabo según los lineamientos de la Comisión Internacional de Tests (International Test Commission, ITC) [18]

Se administraron las diferentes pautas del BSID III y se buscó identificar patrones de desviación (ver punto 5.2) en una población objeto local (divididos en los diferentes grupos etarios de acuerdo al BSID III).

En este trabajo preliminar piloto, cuando se nombra a la escala de "BSID III", se hace referencia a la versión española suministrada por *Pearson Clinical and Talent Assessment.*

4.5 Reclutamiento de pacientes.

En el Hospital de Niños Pedro de Elizalde, los pacientes fueron reclutados al azar, en el sector de Consultorio de Niño Sano, a través de un proceso de selección aleatorio simple, utilizando los números de historia clínica y una tabla de números aleatorios por computadora hasta completar el tamaño muestral establecido.

5 - PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Ordenamiento en la secuencia de los ítems.

Se utilizó la versión en idioma español suministrada por Pearson Clinical.

Cada uno de los 326 ítems pertenecientes a las tres áreas a evaluar (cognitivo, comunicación y motor) tenían asignados un resultado (éxito/fracaso o positivo/negativo). Para evaluar cuáles fueron los ítems apropiados para ser administrados según la edad, se utilizó como punto de partida aquellos pertenecientes a *dos* grupos anteriores con respecto a las normativas americanas originales del BSID III. Esta estrategia intentó abarcar la mayor cantidad de pautas para ser evaluadas, considerando probables diferencias culturales en el patrón cronológico de cumplimiento de las pautas. Se detiene la toma de pautas hasta 5 pruebas/ítems con resultado negativo (regla de discontinuación). Acorde a la progresión en la secuencia de los ítems (pautas), a medida que se avanza en la edad, el grado de dificultad de los ítems aumenta y disminuye la proporción de éxito en los ítems evaluados. Con estos resultados se construyó para cada ítem o pauta, la proporción de niños con éxito en la misma. Cuando algún ítem (pauta) poseía una diferencia mayor al 5 % (proporción mayor o menor) al ítem o pauta precedente o subsiguiente, se identificó como ***desviación.***

Los datos fueron ingresados en una planilla de cálculo de Microsoft Excel de Office Profesional para XP. El análisis se realizó con Microsoft Excel y el programa estadístico Stata versión 8.0 (Stata Statistica, Software. Release 8.0. Collage Station, Tex: Stata Corp; 2003.)

6 - TAMAÑO MUESTRAL

La muestra elegida de 80 pacientes responde a la experiencia de otros autores que realizaron una prueba piloto preliminar para el proceso de adaptación del Test de evaluación del neurodesarrollo [25, 26, 27, 30].

7 - CONSIDERACIONES ÉTICAS

En cuanto a las consideraciones éticas de este proyecto, cabe señalar algunos puntos importantes:

- En todos los casos se aplicó un consentimiento informado que fue diseñado para el estudio (Anexo II).
- Si bien este estudio puede vislumbrar algunos signos de alarma ante posibles desviaciones del neurodesarrollo, quien evidenciara estos datos siempre facilitó el acceso a los diferentes servicios interdisciplinarios de salud si el criterio del profesional de salud así lo indicara, siendo la integridad del paciente la prioridad a resguardar.
- Este plan de trabajo fue presentado en el Comité de Ética y de Docencia e Investigación del Hospital sede.

8 - RESULTADOS

Se han evaluado un total de 110 pacientes. Cada paciente fue evaluado con la prueba de pesquisa del neurodesarrollo PRUNAPE/ cuestionario pre-PRUNAPE. Fueron invitados a participar 68 pacientes (52 con desarrollo típico y 16 con desarrollo atípico), siendo todos ellos evaluados posteriormente con el test de Bayley III. La media de edad fue de 11.4 meses, con una edad gestacional de 38.4 semanas y 3.100 gr de peso de nacimiento. El resto de las características de la población estudiada pueden observarse en la tabla I.

Tabla I Estudio preliminar, características de la población en estudio		
n total		68
Alteraciones del ND n (%)		11 (16)
Proporción de Prematuridad o RCIU		11 (16)
Edad en meses, Media (DS)		11.4 (7.5)
Edad Gestacional en semanas, Media (DS)		38.4 (2.5)
Peso de nacimiento en gramos, Media (DS)		3173 (696)
NBI n (%)		5 (7)
Educación materna	BAJA (primario compl/Incompl)	7 (11)
	MEDIA (secundario	44 (70)

	compl/Incompl)	
	ALTA (terciario compl/Incompl o mayor)	12 (19)
Cobertura salud n (%)	Pública	63 (93)
	Privada/ Obra social	5 (7)

La distribución de evaluaciones según los diferentes grupos de edades son las siguientes:

Tabla II: Grupo etario de pacientes evaluados con Test Bayley III (n=68)

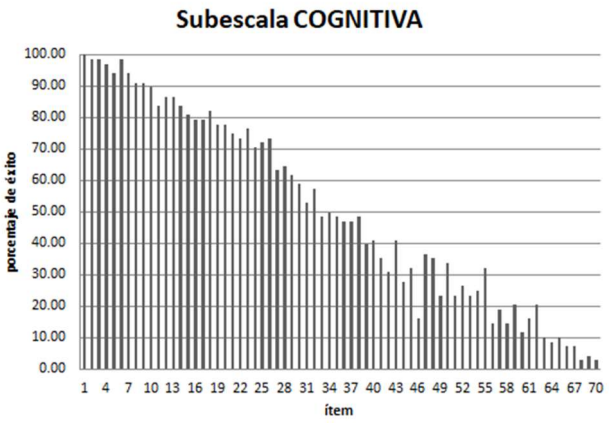
Grupo	Grupo etario	Pacientes evaluados
A	16 días – 1 mes 15 días	2
B	1 mes 16 días – 2 meses 15 días	-3
C	2 meses 16 días – 3 meses 15 días	3
D	3 meses 16 días – 4 meses 15 días	6
E	4 meses 16 días – 5 meses 15 días	5
F	5 meses 16 días – 6 meses 15 días	3
G	6 meses 16 días – 8 meses 30 días	8
H	9 meses 0 días – 10 meses 30 días	6
I	11 meses 0 días – 13 meses 15 días	4
J	13 meses 16 días – 16 meses 15 días	7
K	16 meses 16 días – 19 meses 15 días	8
L	19 meses 16 días – 22 meses 15 días	6
M	22 meses 16 días – 25 meses 15 días	8

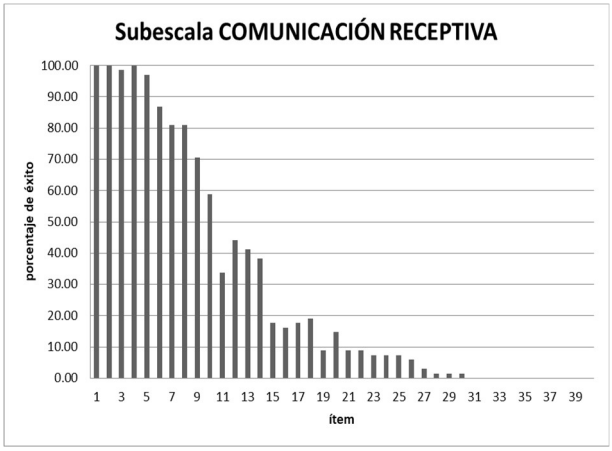
Se detallan a continuación los resultados obtenidos de pacientes en quienes se realizaron Test Bayley III (n =68).

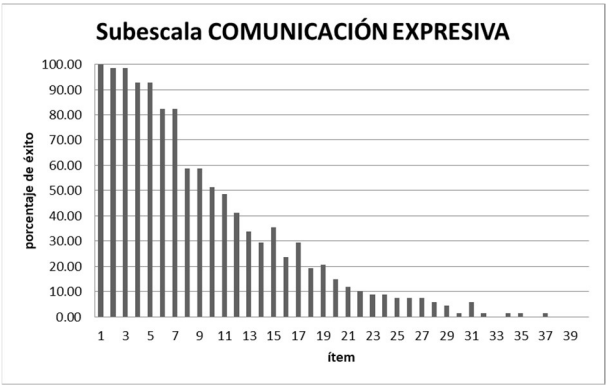
Tabla III Puntajes Test Bayley III en la población objeto. Subescala	Puntaje Escalar Media (DS)	Puntaje Compuesto Media (DS)	Percentil Mediana (RI)
Cognitiva	8 (2.9)	90.4 (15)	25 (12.5- 50)
Comunicación Receptiva	7.7 (3)	89 (16)	34 (8- 46)
Comunicación Expresiva	8.4 (3)		
Motricidad Fina	8.7 (3)	88.4 (15)	24 (8- 42)
Motricidad Gruesa	7.5 (3)		

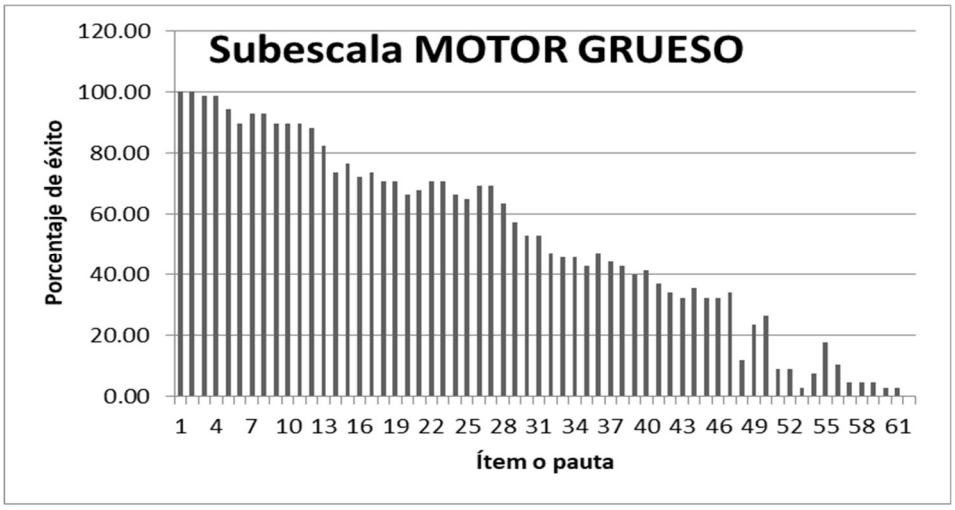
Al realizarse la secuenciación de cada pauta, con su correspondiente proporción (porcentaje) de aprobación, se obtuvo una progresión de éxito decreciente, con algunas desviaciones, como pueden observarse en las siguientes figuras:

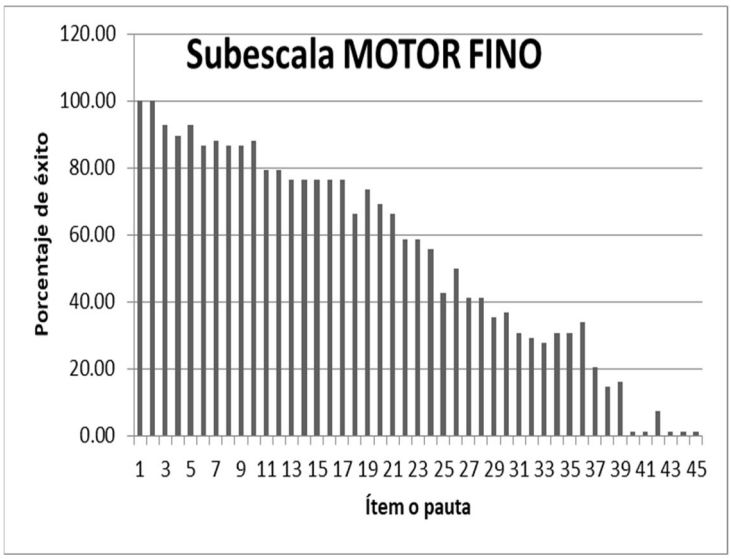
Figura I: Proporción de éxito de cada ítem, en Subtest Cognitivo, Comunicación, Motor.











Desviaciones del patrón de secuencia de los diferentes Ítems.

Fueron examinados todos las pautas (ítems) contempladas en el BSID III en los 68 pacientes de 0 a 24 meses de edad.

Según la construcción del Test Bayley III, recordemos que acorde a la progresión en la secuencia de los ítems (pautas), a medida que se avanza en la edad, el grado de dificultad de los ítems aumenta y disminuye la proporción de éxito en los ítems evaluados. Con estos resultados se construyó para cada ítem/ pauta, la proporción de niños con éxito en la misma. Si bien la proporción de éxito de cada prueba (ítem) va disminuyendo a medida que aumenta la edad y por consiguiente la complejidad de las pruebas, existieron desviaciones en cada una de las áreas estudiadas (Tabla III).

Cuando algún ítem (pauta) poseía una diferencia mayor al 5 % (proporción mayor o menor) al ítem/ pauta precedente o subsiguiente, se identificó como **desviación**. Estas desviaciones tienen cuatro situaciones posibles: (a) Proporción mayor en el porcentaje de éxito en la pauta precedente, (b) Proporción menor en el porcentaje de éxito en la pauta precedente, © Proporción menor en el porcentaje de éxito en la pauta subsiguiente, (d) Proporción mayor en el porcentaje de éxito en la pauta subsiguiente. Aquellos casos (a) y © son pautas "fáciles" y sobreestiman el desarrollo, aquellas situaciones (b) y (d) son

pautas muy complejas para la población estudiada, que subestiman el desarrollo de la población argentina.

Tabla III: Desviaciones de los ítems evaluados en los diferentes Subtest

COGNICIÓN					
Número de Ítem	Proporción Ítem PRECEDENTE y su diferencia		proporción de Ítem con desviación	Proporción Ítem SIGUIENTE y su diferencia	
cog11	89.71	-5.88	83.82	86.76	2.94
cog24	76.47	-5.88	70.59	72.06	1.47
cog27	73.53	-10.29	63.24	64.71	1.47
cog31	58.82	-5.88	52.94	57.35	4.41
cog33	57.35	-8.82	48.53	50.00	1.47
cog39	48.53	-8.82	39.71	41.18	1.47
cog41	41.18	-5.88	35.29	30.88	-4.41
cog43	30.88	10.29	41.18	27.94	-13.24
cog46	32.35	-16.18	16.18	36.76	20.59
cog49	35.29	-11.76	23.53	33.82	10.29
cog51	33.82	-10.29	23.53	23.53	0.00
cog55	25.00	7.35	32.35	14.71	-17.65
cog59	14.71	5.88	20.59	11.76	-8.82
cog63	20.59	-10.29	10.29	8.82	-1.47

(Continuación Tabla III)

COMUNICACIÓN RECEPTIVA					
Número de Ítem	Proporción Ítem PRECEDENTE y su diferencia		proporción de Ítem con desviación	Proporción Ítem SIGUIENTE y su diferencia	
rec6	97.06	-10.29	86.76	80.88	-5.88
rec9	80.88	-10.29	70.59	58.82	-11.76
rec11	58.82	-25.00	33.82	44.12	10.29
rec15	38.24	-20.59	17.65	16.18	-1.47
rec19	19.12	-10.29	8.82	14.71	5.88
rec21	14.71	-5.88	8.82	8.82	0.00

COMUNICACIÓN EXPRESIVA					
Número de Ítem	Proporción Ítem PRECEDENTE y su diferencia		proporción de Ítem con desviación	Proporción Ítem SIGUIENTE y su diferencia	
exp4	98.53	-5.88	92.65	92.65	0.00
exp6	92.65	-10.29	82.35	82.35	0.00
exp8	82.35	-23.53	58.82	58.82	0.00
exp10	58.82	-7.35	51.47	48.53	-2.94
exp12	48.53	-7.35	41.18	33.82	-7.35
exp15	29.41	5.88	35.29	23.53	-11.76
exp17	23.53	5.88	29.41	19.12	-10.29
exp20	20.59	-5.88	14.71	11.76	-2.94

(Continuación Tabla III)

MOTOR FINO					
Número de Ítem	Proporción Ítem PRECEDENTE y su diferencia		proporción de Ítem con desviación	Proporción Ítem SIGUIENTE y su diferencia	
fin3	100.00	-7.35	92.65	89.71	-2.94
fin6	92.65	-5.88	86.76	88.24	1.47
fin11	88.24	-8.82	79.41	79.41	0.00
fin18	76.47	-10.29	66.18	73.53	7.35
fin22	66.18	-7.35	58.82	58.82	0.00
fin25	55.88	-13.24	42.65	50.00	7.35

fin27	50.00	-8.82	41.18	41.18	0.00
fin29	41.18	-5.88	35.29	36.76	1.47
fin31	36.76	-5.88	30.88	29.41	-1.47
fin37	33.82	-13.24	20.59	14.71	-5.88
fin40	16.18	-14.71	1.47	1.47	0.00
fin42	1.47	5.88	7.35	1.47	-5.88

(Continuación Tabla III)

MOTOR GRUESO					
Número de Ítem	Proporción Ítem PRECEDENTE y su diferencia		proporción de Ítem con desviación	Proporción Ítem SIGUIENTE y su diferencia	
gr13	88.24	-5.88	82.35	73.53	-8.82
gr28	69.12	-5.88	63.24	57.35	-5.88
gr32	52.94	-5.88	47.06	45.59	-1.47
gr48	33.82	-22.06	11.76	23.53	11.76
gr51	26.47	-17.65	8.82	8.82	0.00
gr53	8.82	-5.88	2.94	7.35	4.41
gr55	7.35	10.29	17.65	10.29	-7.35
gr57	10.29	-5.88	4.41	4.41	0.00

Como podemos observar en la Tabla III, sobre un total de 326 pautas, fueron detectadas 48 desviaciones (14.7 %). Al analizar la distribución por cada subtest, se observa que el área con mayor índice de discrepancias es el área MOTOR FINO, con un total de 12 desviaciones sobre 66 pautas totales (18 %).

Elección del punto de comienzo.

En base a la sucesión de pautas según el Test Bayley III en su versión original, en este estudio piloto se determinó el punto de comienzo en cada grupo etario cuando se observaban tres pautas consecutivas donde fueran pasadas con éxito en al menos el 95 % de los lactantes/ niños evaluados. De esta manera se pueden observar similitudes y discrepancias con respecto a la versión original (Tabla IV).

Tabla IV: Número de pauta como puntos de comienzo en cada Sub Escala evaluada. Comparación entre versión original y prueba piloto (preliminar) argentina.

Grupo	COGNITIVO (1)		C. Receptiva (2)		C. Expresiva (3)		Motor Fino (4)		Motor Grueso (5)	
	Bayley Original	Prueba piloto	Bayley Original	Prueba Piloto	Bayley Original	Prueba Piloto	Bayley Original	Prueba Piloto	Bayley Original	Prueba Piloto
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	3	5	1	1	1	3	1	1	5	3
D	7	8	3	3	1	3	5	3	9	3
E	16	8	3	4	3	4	10	3	9	9
F	19	18	6	6	3	3	13	15	15	15
G	22	24	6	4	3	3	15	15	19	13
H	25	24	6	4	3	1	19	17	22	21
I	31	25	8	1	7	3	22	15	35	31
J	34	31	10	5	10	7	26	20	39	29
K	40	31	13	10	14	10	28	24	42	36
L	45	36	13	10	17	15	28	27	45	45
M	45	43	15	10	20	11	31	28	48	42

(1) (2) (3) (4) (5) Número de pauta como punto de partida en cada uno de los subgrupos de edad, según versión original y prueba piloto argentina.

A medida que aumenta la progresión de pautas y la complejidad de las mismas, se observan discrepancias en el "punto de comienzo" en todas las áreas evaluadas. Se observa en el estudio piloto "puntos de partida" con pautas pertenecientes incluso hasta *dos* grupos anteriores con respecto a las normativas originales del BSID III. Habiéndose evaluado 13 grupos de edad (A-M), con los consiguientes 13 "puntos de partida" de los cinco subtest, el 70 % de los puntos de partida discrepan con respecto a la versión original (Tabla IV).

9 - ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS ENCONTRADOS

En este estudio piloto fueron incluidos 68 lactantes argentinos del Área Metropolitana, en quienes se les realizó la Escala Bayley de desarrollo infantil III (BSID III) en su adaptación española suministrada por Pearson Clinical and Talent Assessment (Adaptación 2015). Los niños incluidos se encontraban en edades comprendidas entre 1 y 24 meses.

La muestra intentó ser representativa de la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires, sin embargo en este estudio piloto existió una mayor proporción de educación materna baja (11 % de Nivel inicial primario en estudio piloto vs. 2 % en registros DEIS de CABA/ Pcia Bs As), y mayor proporción de población con cobertura de salud pública (93 % en el estudio piloto vs. 58 % en registros DEIS de CABA/ Pcia Bs As).

1° Objetivo: Ordenamiento de Ítems/ pautas.

Uno de los puntos claves para la adaptación del Test es la búsqueda de patrones de desviación para construir la secuencia definitiva de los diferentes ítems que conforman la escala BSID III. Para explorar la secuencia de los ítems/pautas en la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires se midió la proporción de éxito de cada prueba y se buscó las discrepancias con la versión original del BSID III.

La proporción de desviaciones encontradas fue del 14,7 %, proporción similar a otros autores [26]. Steenis y col.[26] en el año 2015, durante el proceso de adaptación del BSID III en la población de Holanda, encontró una proporción de discrepancia del 12 %. En el presente estudio piloto, la proporción de discrepancia fue en promedio 14.7 % con una dispersión del 11 al 18 %, siendo el área MOTOR FINO donde se encontró la mayor proporción de desviaciones.

2° Objetivo: Elección de puntos de comienzo.

Para la selección de los puntos de comienzo en cada subtest que conforman la versión original del BSID III en relación con el grupo etario, debe aclararse el siguiente concepto: luego de la identificación de los diferentes patrones de desviación, el ordenamiento o las modificaciones en la secuencia no podían ser realizadas debido que no se dispone de la licencia de *Pearson Clinical*, por tal motivo con la secuencia original intacta se buscó la sucesión de las primeras tres pautas con la menos el 95 % de éxito en el grupo etario analizado. Con este procedimiento, fueron identificadas un número considerable de diferencias con respecto a los "puntos de comienzo" entre la versión original y prueba piloto argentina. Esto evidencia en la población local un patrón cronológico de cumplimiento de pautas con mayor nivel de dificultad con respecto a la versión original estadounidense. Por tal motivo, hasta disponer de la licencia para la modificación y el reordenamiento de la secuencia de ítems, se sugiere comenzar **dos** grupos antes del estipulado por el BSID III original.

Es importante considerar que no hay precedentes ni experiencias locales en nuestro país de este procedimiento de adaptación, con el consiguiente ordenamiento de la secuencia

de ítems y búsqueda de puntos de inicio. Por tal motivo, para no subestimar o sobreestimar la evaluación del desarrollo, se realizan las sugerencias arriba detalladas.

Las puntuaciones y baremos empleados en la versión en español son los de la versión americana de la prueba que están construidos sobre la muestra original. Aunque se ofrecen argumentos sobre la aplicabilidad de estos baremos en la muestra española, éstos no están apoyados por estudios empíricos con equivalencia métrica de las puntuaciones ni la equivalencia de las distribuciones de las poblaciones, y menos aún en población argentina.

Limitaciones y fortalezas.

En este estudio piloto se identificaron las siguientes limitaciones:

- La población reclutada fue de CABA y Provincia de Buenos Aires, no fueron incluidos niños del interior del país.
- El tamaño muestral corresponde a un estudio piloto ("n" reducido), y el grupo etario reclutado fueron menores de 24 meses.
- Representatividad: La población reclutada no presentó exactamente las mismas características demográficas de la población de CABA y Provincia de Buenos Aires (en la población piloto fueron incluidas una baja proporción de pacientes de Medicina Prepaga y Nivel socioeconómico medio/alto).
- La pandemia del SARS COV-2 y el consiguiente aislamiento obligatorio limitó la concurrencia de los pacientes al Hospital Pedro de Elizalde, provocando retraso en la velocidad de reclutamiento y dificultades para alcanzar el tamaño muestral.
- Ausencia de licencia por parte de *Pearson Clinical and Talent Assessment* para construir un nuevo ordenamiento y secuencia de los ítems adecuados a la población local.

En este estudio piloto se identificaron las siguientes fortalezas:

Originalidad: La escala BSID III se encuentra disponible en idioma inglés y español, sin embargo no existen estudios de adaptación y validación en nuestro país. El presente estudio piloto es el primer proyecto que pone a prueba la secuencia de pautas contenidas en el BSID III, así como el desempeño en una población local argentina.

10 - CONCLUSIONES

- En este estudio preliminar realizado en la población de la Ciudad y Provincia de Buenos Aires, **una de cada siete pautas** que conforman la secuencia de los subtests del BSID III tienen un patrón de **desviación** con respecto al ordenamiento de la versión original.
- Los puntos de comienzo para la administración de cada subtest tienen un alto grado de discrepancia con respecto a la versión original del BSID III.
- Para la utilización en la Argentina de la Escala de BSID III en su versión en español, hasta tanto no se disponga de una adaptación cultural en un tamaño muestral mayor

(con adecuación de modismos, análisis de ambigüedades, adaptación de expresiones lingüísticas y un ordenamiento de pautas adecuada a la población local), se sugiere utilizar como punto de partida (elección de puntos de comienzo) aquellos pertenecientes a **dos grupos** anteriores con respecto las normativas originales del BSID III.

11 - BIBLIOGRAFÍA

1) Figueiras A, de Souza I, Rios V, Benguigui Y. Manual para la vigilancia del desarrollo infantil (0 a 6 años) en el contexto de Atención Integrada de las Enfermedades Prevalentes de la Infancia (AIEPI). Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud. Segunda Edición. 2011; (1): 1-5. (Serie OPS/FCH/HL/11.4. E).

2) Schapira I, Toledo S, Roy E. Los años formativos. Desarrollo e intervención oportuna en los primeros cinco años de vida. Primera edición. Buenos Aires: Fundación Neonatológica para el Recién Nacido y su Familia, 2010; (1) 21-38.

3) Doyle L, Anderson P, Battin M, Bowen J, Brown N, Callanan C, Campbell C, Chandler S, Jeanie Cheong J, Darlow B, Davis P, DePaoli T, French N, McPhee A, Morris S, O'Callaghan M, Rieger I, Gehan Roberts, Spittle A, Wolke D, Woodward L. Long term follow up of high risk children: who, why and how? BMC Pediatrics 2014; 14 (279); 1-15.

4) Zuluaga J A. Cómo se desarrolla el sistema nervioso. Fundamentos genéticos del desarrollo. Luis Arturo Lizcano Gil. Neurodesarrollo y estimulación. Editorial Panamericana. Bogotá Colombia 2001; 33-41.

5) Lejarraga H. Evaluación del desarrollo. Sociedad Argentina de Pediatría. Programa Nacional de Actualización pediátrica 2016, 2: 12-49.

6) Boyle C., Boulet S., Schieve L., Cohen R, Blumberg S, Yeargin-Allsopp M, Visser S, Kogan M. Trends in the Prevalence of Developmental Disabilities in US Children, 1997–2008. Pediatrics 2011.

7) Centers for Disease Control and Prevention. Data and statistics for cerebral palsy: prevalence and characteristics. Disponible en: https://www.cdc.gov/media/releases/2012/p0329_autism_disorder.html. Accessed october 01, 2017.

8) Lejarraga H. Prevención secundaria de la discapacidad: la detección oportuna de trastornos del desarrollo en la infancia. Medicina Infantil, XV, (2), 141-149., 2008.

9) Fernández R, D'Apremont I, Domínguez A, Tapia JL; Red Neonatal Neocosur (Vain N. E.) Survival and morbidity of very low birth weight infant in a South American neonatal network Arch Argent Pediatr. 2014; 112 (5): 405-12.

10) Kallioinen M, Eadon H, Murphy S, Baird G. Developmental follow-up of children and young people born preterm: summary of NICE guidance. BMJ 2017;358: j3514 doi: 10.1136/bmj. j3514 (Published 2017 August 10).

11) Vanderbilt D., Gleason M. Mental health concerns of the premature infant through the lifespan. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am. 2010; 19(2):211-28.

12) Rodríguez D., Couceiro C., Oreiro V. Seguimiento de prematuros. Programa Nacional de Actualización Pediátrica, Sociedad Argentina de Pediatría 2013 (2); 53-90.

13) Dirección de Estadísticas e Información de Salud. Estadísticas vitales. Información básica. Año 2015. Serie 5. N° 59. Disponible en: http://www.deis.msal.gov.ar/

14) Giúdici L, Bokser V, Maricic M, Golombek S, Ferrario C. Babies born with gastroschisis and followed up to the age of six years faced long-term morbidity and impairments. Acta Pædiatrica. 2016; DOI:10.1111/apa.13374

15) Giúdici L, Bokser V, Golombek S, Castrillón C, Trovato M, Ferrario C. Esophageal atresia: long-term interdisciplinary follow-up. Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine. 2016;5(2): e050206 doi: 10.7363/050206

16) Bokser V, Giúdici L, Ferrario C. Seguimiento del Recién Nacido con antecedente de Cirugía Compleja Neonatal: Evaluación del neurodesarrollo. Revista Pediátrica Elizalde 2012; 3: 71–6.

17) Oiberman A, Orellana L, Mansilla M. Evaluación de la inteligencia en bebés argentinos: Escala Argentina de Inteligencia Sensoriomotriz. Arch Argent Pediatr 2006; 104(4):316-324.

18) Muñiz J, Elosua P, Hambleton R. Directrices para la traducción y adaptación de los tests: segunda edición. Psicothema 2013; 25 (2): 151-157. doi: 10.7334/psicothema 2013.24.

19) Alberto Fernández, Edgardo Pérez, Ana María Alderete, María Cristina Richaud & Mercedes Fernández Liporace. ¿Construir o Adaptar Test Psicológicos? Diferentes Respuestas a una Cuestión Controvertida. Evaluar. 2010; (10): 60 – 74.

20) Mikulic I. Construcción y adaptación de pruebas psicológicas. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Psicología. Disponible en: http://23118.psi.uba.ar/academica/carrerasdegrado/psicologia/informacion_adicional/obligatorias/059_psicometricas1/tecnicas_psicometricas/archivos/f2.pdf

21) Lejarraga C, Charrúa, et al. Validación de un formulario para la detección de niños con alto riesgo de padecer trastornos del desarrollo. Cuestionario PRUNAPE pre-pesquisa. Arch Argent Pediatr 2013; 111(6)476-483.

22) Oiberman A, Paolini C, Mansilla M. Escala Argentina de Inteligencia Sensorio-Motriz (EAIS): Percentiles nacionales. Interdisciplinaria 2012; 29 (2).

23) IODI. Instrumento de Observación del Desarrollo Infantil. Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000843cnt-iodi.pdf

24) Rubio-Codina M. R., María Caridad Araujo, Attanasio O, Grantham-McGregor S. Validez concurrente y viabilidad de pruebas cortas comúnmente usadas para medir el desarrollo infantil temprano en estudios a gran escala: Metodología y resultados Banco Interamericano de Desarrollo. Trabajo BID Nº IDB-WP-723, agosto 2016.

25) Gasparini C, Caravale B, Rea M, Coletti M, Tonchei V, Bucci S, Dotta A, De Curtis M, Gentile S, Ferri R. Neurodevelopmental outcome of Italian preterm children at 1 year of corrected age by Bayley-III scales: An assessment using local norms. Early Human Development 2017; (113) 1–6.

26) Steenis L, Marjolein Verhoeven, Dave J. Hessen & Anneloes L. van Baar (2014) First steps in developing the Dutch version of the Bayley III: Is the original Bayley III and its item sequence also adequate for Dutch children? European Journal of Developmental Psychology, 2014; 11 (4): 494-511, DOI: 10.1080/17405629.2013.869207

27) Azari. N, Soleimani F, Vameghi R, Sajedi F, Shahshahani S, Karimi H, Kraskian A, Shahrokhi A, Teymouri R, Gharib M. A Psychometric Study of the Bayley Scales of Infant and Toddler Development in Persian Language Children. Iran J Child Neurol. 2017; 11(1):50-56.

28) Bayley, N. Bayley Scales of Infant and Toddler Development–Third Edition. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. Journal of Psychoeducational Assessment. 2007; 25 (2): 180-190. DOI: 10.1177/0734282906297199

29) Rodríguez M., Calderón L., Cabrera L., Ibarra N., Moya P., Faas A. Análisis de Consistencia Interna de la Escala Bayley del Desarrollo Infantil para la Ciudad de Córdoba (Primer año de Vida). Evaluar 2005 (5); 55-69.

30) Oiberman, A. J., Santos, M. S., Mansilla, M., Dehollainz, I., Trucco, M. A., Menghi, M. S., et al. Resultados preliminares de 7 provincias argentinas en el marco de una propuesta de evaluación nacional de la inteligencia sensorio-motriz a bebés de 6 a 30 meses. Anuario de Investigaciones. 2010; 17: 213-227.

ABSTRACT

Introduction

Counting on standardized and validated instruments for child neruodevelpment's evaluation must be a priority. One of the most employed tools to get a diagnosis in disorders in that area is the American test Bayley III (BSID III), however there is not a cross cultural adaptation suitable for Argentina.

Aims

1. To identify deviation's patterns between the results from the original test, and the ones obtained from the local population.
2. To select the proper starting point according to each age group, for the performance of every subtest included in the BSID III.

Methods

Preliminar study of the adapted test. Using STATA 8.0, Microsoft Excel and the results from the administered test, it was analyzed any deviation of items' sequence and starting points.

Participants

68 children from 16 days to 24 months old, born and raised in CABA and PBA, Argentina.

Results

- A proportion of 14,7% items (48 out of 326), showed a deviation in sequence.
  - The area with the higher rate detected is FINE MOTOR (18%).
- Regarding the starting points, 70% of discrepancies with the original version were identified.

Conclusion

One out of seven subtests of the BSID III have a pattern of deviation when the test was conducted as the original version. Meanwhile, the items used as starting points in the original one have an elevated degree of discrepancy.

For the administration of the BSID III in Argentina, it is suggested to consider as starting points the ones belonging to 2 younger age groups.

Anexo I. Test de Evaluación del Neurodesarrollo Infantil Bayley III

La BSID III, es utilizada en niños de 1-42 meses de edad, habiéndo logrado en ésta última versión mayor precisión de las pruebas con un fortalecimiento de la calidad psicométrica (Sensibilidad 0.75-0.86; Especificidad 0.75-0.86). Es una de las pruebas de desarrollo más usadas para la evaluación de la primera infancia, habiendo sido pensada originalmente para dimensionar el estado de desarrollo en niños muy pequeños, aunque también se la utiliza en sujetos con profundo deterioro cuya edad mental no supere los tres años y medio. Al ser una prueba diseñada para detectar retrasos o demoras en el desarrollo, posibilita aminorar el impacto o daño de diferentes alteraciones que afectan el sistema nervioso del niño, pues permite reforzar y potenciar la función de plasticidad neuronal que acompañan los primeros años de desarrollo tanto a nivel cerebral como de sistema nervioso en general (28).

La prueba está constituida por cinco áreas diferenciadas: (1) Cognición, (2) Comunicación, que informa sobre aspectos relacionados con la capacidad de comunicación como la percepción, memoria, aprendizaje, vocalización; (3) área Motora, la cual evalúa el grado de coordinación corporal, así como habilidades motrices finas en manos y dedos; (4) área Social-emocional, que permite obtener información sobre sus actitudes, intereses, emociones, nivel de actividad y motivación de logro. La prueba también recoge información cualitativa sobre la conducta del niño, (5) área Adaptativa, dónde se evalúa la interacción con la madre y con extraños (evaluador) en una variedad de situaciones. (28)

La prueba permite la obtención de puntajes directos para cada escala que se otorgan sumando la cantidad de elementos logrados por el niño. Estos puntajes se suman con otro al que se denomina básico, así se avanza hasta llegar al techo o máximo de respuesta alcanzado. Estos puntajes son luego organizados en torno a un índice de desarrollo que permite categorizar al niño según su rendimiento en las escalas, se posee entonces un Índice de desarrollo cognitivo, del lenguaje, motor (28).

La escala presenta una consistencia interna con coeficientes alfa en la población norteamericana de entre 0,78 a 0,93 según estudios realizados con la versión del año ’93, esto sugiere una prueba con un nivel de confiabilidad adecuado a las exigencias psicométricas estándares de acuerdo con los planteamientos de la American Psychological Association (APA). Entre las ventajas y consideraciones que podemos mencionar respecto a este instrumento, están los siguientes aspectos:

Permite una variada valoración del desarrollo al considerar las sub-pruebas como áreas complementarias, se cuenta con condiciones estandarizadas de administración y un conjunto de instrucciones precisas y rigurosas que facilitan la tarea. Aunque el orden de presentación de los elementos no exige un orden predefinido por el autor, se sugiere iniciar la prueba por la escala cognitiva, para aprovechar el máximo de disponibilidad energética del examinado.

Cada escala provee un puntaje directo, un Score Compuesto (M= 100; DS 15), un puntaje escalar (M=15; DS 3) y una distribución en percentilos. **El paciente se clasifica como patológico cuando obtiene un puntaje en uno de los índices por debajo de 2 desvíos estándar (69 puntos o menos en el Score Compuesto) o un Puntaje Escalar menor a 8** (26, 28).

Según las características del BSID III descritas anteriormente, la esencia de la construcción del test se basa en la sucesión de pautas madurativas (ítems) que van aumentando la complejidad a medida que se avanza en la edad cronológica. El orden de la secuencia de los ítems o pautas está determinado según la complejidad o dificultad de aprobación de los mismos.

La administración del test comienza a una edad cronológica definida (punto de comienzo). Si el niño falla en uno de los tres primeros ítems luego del punto de comienzo, debemos retroceder hasta el punto de comienzo anterior (regla reversa). La administración del Test se detiene cuando el niño falla en cinco ítems consecutivos (regla de discontinuación). Como fue detallado anteriormente, la prueba permite la obtención de puntajes directos para cada escala que se otorgan sumando la cantidad de elementos (o ítems) logrados satisfactoriamente por el niño. Estos puntajes luego son organizados en torno a un índice de desarrollo que permite categorizar al niño según su rendimiento de las áreas evaluadas. (26, 28)

Anexo II: Formulario de información y hoja de firmas de Consentimiento Informado

Título: Estudio preliminar de adaptación transcultural de la Escala de Evaluación del Neurodesarrollo Infantil Bayley III en Buenos Aires, Argentina.

Investigador principal: Vivian Bokser.
Hospital sede: Pedro de Elizalde, CABA. Domicilio Montes de Oca 40, CABA.

El neurodesarrollo consiste en la habilidad que va adquiriendo el niño para poder desarrollar su inteligencia, la coordinación de los movimientos, el aprendizaje, el lenguaje y la respuesta emocional adaptada a todas las etapas de la vida.

En todo examen pediátrico de salud debe incluirse el control del neurodesarrollo a fin de mantener una vigilancia y detectar trastornos en los que se pueda realizar una intervención temprana y oportuna.

Existe un Test para el diagnóstico de trastornos del desarrollo llamado Bayley III, el más utilizado a nivel mundial, pero este test fue creado en Estados Unidos y es probable que no se adapte a las características culturales de nuestro país, por lo tanto, creemos de suma importancia para nuestra población de niños argentinos que haya un test de Bayley III adaptado localmente. En esta oportunidad se le está invitando a participar en el estudio de investigación creado para este fin. Consiste en poder adaptar el test de evaluación del neurodesarrollo Bayley III para niños entre 1 mes y 3 años y medio de edad. En este estudio, los niños que participen serán evaluados por diferentes pruebas para conocer su capacidad de resolver problemas, su lenguaje (como se expresa y que entiende), sus habilidades de movimientos y destrezas, sus respuestas a determinados juegos, así como algunas preguntas al padre o madre, acerca de hábitos de su hijo. El test Bayley III utilizado, es atractivo y entretenido para el niño. La prueba puede insumir entre 30 a 90 minutos, según la edad de cada niño. En caso de fatiga o aburrimiento, se puede realizar las pruebas en dos oportunidades diferentes. Luego de obtenidos los resultados de la evaluación se realizará un registro de los resultados de su hijo, que, junto con el de otros niños que participen en el estudio nos permitirá conocer si este test realmente se adapta o es adecuado para niños que viven en Buenos Aires.

En un futuro, esto podría beneficiar a muchos niños. En este estudio solo se registraran los datos obtenidos de la prueba realizada a su hijo/a.

Se mantendrá la confidencialidad de su identidad, no registraremos su nombre ni el de su hijo/a, ni ninguna información que los identifique. La información será guardada en un lugar seguro y solamente tendrán acceso a la misma el equipo de investigación. Los datos serán guardados en computadoras con clave y con acceso restringido al equipo de investigación.

La participación o no en esta investigación no modificará en absoluto el trato del médico o cualquier otro profesional de la Institución participante hacia usted o su hijo. La investigación no interferirá en el examen físico que haga el médico, ni tampoco se modificarán

los tratamientos que este indique. En el caso de no participar, lo que sucederá es que los datos NO serán registrados en el estudio.

Cuando usted lo desee podrá retirarse de esta investigación sin que esto produzca algún cambio en la atención de su hijo.

Si su hijo presenta algún problema detectado por estas pruebas, y aún no estuviera en tratamiento, nuestro grupo de profesionales le facilitará el acceso para su resolución.

Tómese el tiempo necesario para decidir participar del estudio.

Nos complacerá responder cualquier pregunta con respecto al mismo. Ante cualquier inquietud puede comunicarse al teléfono: 4363 2100 interno 6082 (Lunes a Viernes 8-12.00 hs).

Luego de haber sido informada convenientemente de los alcances del estudio, acepto participar del mismo.

Entiendo que puedo dejar de participar en cualquier momento. Mi firma indica también que he recibido una copia del mismo.

Nombre del padre y madre/tutor	Nombre Investigador
FIRMA DNI	FIRMA DNI
FECHA	FECHA

USO DEL TRABECULAR BONE SCORE (TBS) PARA LA DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL RIESGO DE FRACTURAS VERTEBRALES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA

María Lorena Brance, Bernardo A. Pons-Estel, Norberto J. Quagliato, Marisa Jorfen, Guillermo Berbotto, Mariano Palatnik, J. Percudani, Naraline Luna Meneses, Agustín Razzini, Julio Miljevic, P. Rubio, Lucas R. Brun

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

Durante el crecimiento la masa ósea aumenta gradualmente hasta los 30 años de edad en los que se alcanza el pico de masa. Luego hay un período de equilibrio donde la masa ósea, de no mediar enfermedad, se mantiene. Sin embargo, luego de los 40 años aproximadamente se produce una pérdida fisiológica y paulatina de la masa ósea tanto para hombres como para mujeres siendo ésta acentuada en las mujeres luego de la caída de estrógenos secundaria a la menopausia en la mujer y luego de los 70 años en el hombre.[1,2]

Existe evidencia de que las enfermedades reumatológicas autoinmunes afectan negativamente la masa ósea por diferentes mecanismos. En el caso de la AR los efectos sobre la masa ósea han sido más estudiados. La osteoporosis periarticular en la AR se inicia a las pocas semanas del comienzo de la enfermedad siendo un cambio muy característico, mientras que la osteoporosis generalizada se manifiesta tardíamente constituyendo una causa muy importante de osteoporosis secundaria. La AR tiene un impacto negativo sobre la masa ósea incluso en pacientes premenopáusicas.[3] Las principales células vinculadas en la patogénesis de la AR y la destrucción ósea son los linfocitos y los macrófagos. Éstos tienen la capacidad de secretar diversos tipos de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-11, IL-15 e IL-17 y TNF-α que pueden inducir la formación y activación de los osteoclastos. IL-6 y IL-11 están implicadas además en la osteoporosis por déficit estrogénico.[4,5]

Las fracturas por fragilidad son una complicación importante en pacientes con enfermedades reumatológicas. Los pacientes con AR tienen alta prevalencia de fracturas osteoporóticas, tanto vertebrales como no vertebrales. Estas fracturas alteran de forma importante la calidad de vida, con una elevada morbilidad y mortalidad, y aumento de los costos del sistema de salud. También han sido asociadas al uso de GC y al impacto negativo de la propia actividad de la enfermedad sobre el tejido óseo.[6,7,8] Aun dosis bajas de 2.5 mg de prednisolona o equivalente por día administrada por más de tres meses aumenta notablemente el riesgo de fracturas vertebrales.[9] En pacientes con diagnóstico de AR se halló que la densidad y los índices de microestructura correlacionaron significativamente con la actividad de la enfermedad, determinado por tomografía computada periférica cuantitativa de alta resolución (HR-pQCT).[10] Sin embargo, esta metodología se realiza en radio y la poca disponibilidad de equipos no permite que sea aplicable a condiciones de práctica clínica. El Trabecular Bone Score (TBS) es una nueva

técnica de imagen, basada en imágenes DXA estándar de la columna lumbar, que proporciona información adicional a los resultados de DMO estándar. En los últimos años, un gran número de estudios han demostrado que el TBS se asocia significativamente con mediciones directas de la microarquitectura ósea, predice fracturas de fragilidad actuales y futuras en la osteoporosis primaria y puede ser útil con la DMO para la detección y predicción de fracturas de fragilidad ósea.[11,12,13,14] Trabajos previos han demostrado su utilidad en artritis reumatoidea.[15,16]

Por ello, nos planteamos como objetivo de este trabajo evaluar la masa ósea y la prevalencia de fracturas vertebrales (VFx) en pacientes con AR y la utilidad del TBS en artritis reumatoidea.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio transversal descriptivo observacional en pacientes con artritis reumatoidea (grupo AR) pertenecientes a la ciudad de Rosario (Argentina) en condiciones habituales de la práctica clínica. En el grupo AR se incluyeron pacientes mayores de 18 años, de ambos sexos, con diagnóstico de AR, que aceptaron participar y firmaron voluntariamente el consentimiento informado que reúnan los criterios 2010 ACR-EULAR. Se excluyeron aquellos pacientes menores de 18 años de edad, se encuentren cursando un embarazo, padezcan alguna otra enfermedad autoinmune, que tomen GC por otra causa o drogas que afecten el metabolismo óseo y de la vitamina D, que presenten malabsorción intestinal, enfermedades oncológicas, enfermedad renal o hepática crónica. Como grupo control se incluyeron individuos sin enfermedad reumatológica autoinmune apareado por edad, sexo e índice de masa corporal.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas. UNR (1MED486).

La evaluación de la densidad mineral ósea (DMO) se realizó por DXA con un equipo Hologic Discovery Wi a nivel de columna lumbar (L1-L4). Las fracturas vertebrales se determinaron por DXA (VFA - Vertebral Fracture Assessment) (D4-T4) donde se determina la altura (en mm) de cada vértebra a nivel anterior, medio y posterior, se calcula el porcentaje de deformación de cada vértebra. De esta forma las fracturas vertebrales se clasificaron acorde a la clasificación de Genant en grado I cuando la reducción es del 20-25%, grado II cuando la reducción de altura es del 25-40%, y grado III o severa cuando la disminución de altura es mayor al 40% de la altura del cuerpo vertebral.[17]

La evaluación de la microarquitectura ósea se llevó a cabo utilizando el TBS (Trabecular Bone Score, software TBS iNsight, Medimaps Group)[16] Un valor bajo de TBS se asocia a un incremento de fracturas independientemente de los factores de riesgo y la DMO.[12] Se considera normal con TBS $\geq$1.35, parcialmente degradado entre 1.20 y 1.35 y degradado con TBS $\leq$1.20.

Análisis estadístico de los datos. Sobre los datos de las variables cuantitativas se evalúo en primer término la distribución de los datos (test de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de la varianza (test de Bartlett) para determinar el uso de test paramétricos o no paramétricos. Las variables continuas independientes entre dos grupos se analizaron utilizando test t-Student o Mann-Whitney. Para la comparación de variables nominales se empleó el test de chi cuadrado o test exacto de Fisher. En todos los casos se considerará significancia estadística cuando $p<0.05$.

RESULTADOS

Se incluyeron 84 sujetos controles y 89 con AR sin diferencias en edad e IMC. El grupo AR mostró significativamente menor DMO de columna lumbar (-8.6%) y TBS (-4.6%) respecto del grupo control. Además, se encontró mayor porcentaje de valores normales de TBS (≥1.35) en el GC (GC: 80%; AR: 63%, p<0.05) (Tabla I).

Tabla I.

	GC (n=84)	**AR** (n=89)	**p**
Edad (años)	56.1±12.7	52.6±11.6	ns
IMC (kg/m^2)	27.9±4.7	27.8±4.7	ns
DMO CL (g/cm^2)	1.012±0.127	0.925±0.147 (-8.6%)	p<0.0001
TBS	1.425±0.113	1.340±0.126 (-4.6%)	p=0.0002
Prevalencia de VFx	14.3% [12/84]	49.4% [44/89]	p=0.0004

La prevalencia de VFx fue significativamente mayor en el grupo AR (14.3% vs 49.4%, OR: 5.8; p <0.0001). Asimismo, entre los sujetos con VFx se observaron características disímiles del número y severidad de las mismas entre ambos grupos. Mientras que en todos los fracturados (12/84) hallados en el GC presentaron fracturas únicas (grado I), entre los pacientes con AR fracturados (44/89) el 61.4% (27/44) presentó fracturas únicas (70% grado I, 30% grado II) y el 38.6% presentó fracturas múltiples (de 2 a 4; 67% grado I, 33% grado II). Por otro lado, de la totalidad de fracturas solo un sujeto (2%) presentó VFx sintomáticas, mientras que el resto fueron asintomáticas.

Por último, analizamos la DMO y TBS de los pacientes fracturados donde observamos que los sujetos con VFx presentaron significativamente menor DMO de columna lumbar y menor TBS. Asimismo, la media del valor de TBS se halló en rango normal para los sujetos no fracturados, y parcialmente degradado para los pacientes con VFx.
Si bien la edad de los sujetos fracturados es mayor respecto de los no fracturados, no se observó una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla II.

	Fracturas		
	No (n=117)	**Si** (n=56)	**p**
Edad (años)	52.5±11.9	55.1±12.2	ns
DMO CL (g/cm^2)	0.973±0.137	0.911±0.155	p=0.02
TBS	1.389±0.111	1.342±0.129	p=0.03

DISCUSIÓN

La AR como otras enfermedades reumatológicas autoinmunes afectan negativamente la masa ósea por diferentes mecanismos: la propia actividad de la enfermedad, el uso de glucocorticoides, el sedentarismo, la sarcopenia, la baja ingesta de calcio, conducirán a un aumento del remodelado óseo y a una baja masa ósea u osteoporosis.[6,9] El hueso trabecular es el compartimiento más afectado inicialmente, por ello la afectación inicial de a nivel vertebral con el consiguiente riesgo de fracturas.

En este trabajo pudimos demostrar una alta prevalencia de VFx, mayoritariamente asintomáticas y con un elevado porcentaje de VFx múltiples en pacientes con AR. El uso del VFA y el TBS podría considerarse como un enfoque complementario a la DMO para la evaluación de la presencia de fracturas y la evaluación de la microarquitectura ósea en pacientes con AR.

Consistentemente con nuestros hallazgos, otros autores hallaron VF con mayor frecuencia, graves y múltiples en pacientes con AR pero con un OR menos (1.7 vs 5.8).[18] La diferencia podría explicarse por un mayor número de pacientes con AR (n=208) y en la población evaluada (Japón).

Otro trabajo que evaluó 172 mujeres con AR halló un 36% de VFx utilizando, al igual que en nuestro trabajo, el VFA. Sus datos sugieren que AR es un factor de riesgo por sí mismo para el desarrollo de osteoporosis y VFx y este riesgo aumenta más con el bajo peso, la duración de la enfermedad y el curso severo de la enfermedad.[19]

Aunque la DMO es el método estándar de oro para la evaluación de la densidad mineral ósea, el 40-50% de las fracturas se producen aun con DMO en rango de normalidad o baja densidad ósea (osteopenia). Por ello la relevancia de evaluar la utilidad del TBS como herramienta complementaria en nuestra población de estudio. Consistentemente con nuestros resultados, en un estudio previo donde estudiaron 185 mujeres de 56.0±13.5 años con AR se halló DMO y TBS significativamente más bajas en pacientes con VFx que en pacientes sin VFx.[20] Sin embargo, el valor umbral de TBS hallado que discrimina fracturados de no fracturados hallado fue del 1.173 el cual está en rango de TBS degrado y por debajo de nuestra media de TBS en pacientes fracturados (1.342). No obstante, este valor umbral no presentó alta sensibilidad (63%) y especificidad (74%) y el trabajo no contó con un grupo control de sujetos sanos. De todas maneras, los autores sugieren que, en pacientes con osteopenia, el TBS podría ayudar a detectar pacientes con VFx. Otro trabajo en 100 pacientes mujeres postmenopásicas de Corea con AR se halló 26 pacientes (26%) con VFx moderadas/severas y el TBS fue superior a la BMD en la identificación de VFx prevalentes en pacientes con AR, especialmente en los que usan GC.[21] Otro estudio donde evaluaron 279 sujetos halló 34 pacientes con VFx (12.5%) y si bien la DMO no mostró diferencias entre fracturados y no fracturados, si hubo diferencias al analizar la microarquitectura ósea por TBS (p=0.005). El TBS correlacionó negativamente con la dosis acumulada de glucocorticoides, pero no parámetros relacionados a la actividad de la enfermedad de la AR con el DAS28 o la velocidad de eritrosedimentación.[15] La utilidad del TBS también fue evaluada en otras enfermedades autoinmunes reumatológicas. Kim et al estudiaron a 53 mujeres posmenopáusicas con polimialgia reumática y hallaron 30.2% de VFx lo cual fue significativamente mayor que en pacientes con AR (13.2%) y controles (13.2%, p=0.017). Asimismo, el TBS promedio de los pacientes con polimialgia reumática (1.317±0.092) fue significativamente menor que el de los pacientes con AR (1.336±0.089) y los sujetos controles (1.373±0.073, p<0.01).[22]

CONCLUSIONES

La AR presenta alta prevalencia de VFx, mayoritariamente asintomáticas y con un elevado porcentaje de VFx múltiples. El uso del VFA y el TBS podría considerarse como un enfoque complementario a la DMO para la evaluación de la presencia de fracturas y la evaluación de la microarquitectura ósea en pacientes con AR.

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria sistémica crónica con elevada prevalencia de osteoporosis y aumento del riesgo de fracturas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la masa ósea y la prevalencia de fracturas vertebrales (VFx) en pacientes con AR. Materiales y métodos: Se realizó un estudio observacional de corte transversal en el cual se incluyeron pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de AR. Se realizó densidad mineral ósea (DMO) de columna lumbar (L1-L4) con un equipo Hologic Discovery Wi. La microarquitectura ósea se evalúo por TBS (*Trabecular Bone Score*). La prevalencia de fracturas vertebrales se analizó a través de densitometrías de columna lateral (T4-L4) por DXA (*VFA, Vertebral Fracture Assessment*). La diferencia se consideró significativa si $p<0.05$. Resultados: Se incluyeron 84 sujetos controles y 89 con AR sin diferencias en edad e IMC (edad= GC: 56.1±12.7; AR: 52.6±11.6 años; IMC= GC: 27.9±4.7; AR: 27.8±4.7). El grupo AR mostró significativamente menor DMO de columna lumbar (1.012±0.127 vs 0.925±0.147, -8.6%; $p<0.0001$) y menor TBS (1.425±0.113 vs 1.340±0.126, -4.6%; $p=0.0002$) respecto del grupo control. La prevalencia de VFx fue significativamente mayor en el grupo AR (14.3% [12/84] vs 49.4% [44/89], OR: 5.6; $p=0.0004$). Los sujetos del GC con VFx (12/84) presentaron fracturas únicas. Entre los pacientes con AR con VFx (44/89) el 61.4% (27/44) presentó fracturas únicas (70% grado I, 30% grado II) mientras que el 38.6% presentó fracturas múltiples (de 2 a 4; 67% grado I, 33% grado II). De la totalidad de fracturas solo un sujeto (2%) presentó VFx sintomáticas, mientras que el resto fueron asintomáticas. Los sujetos con VFx presentaron significativamente menor DMO de columna lumbar (VFx no: 0.973±0.137, VFx si: 0.911±0.155, $p=0.02$) y menor TBS (VFx no: 1.389±0.111, VFx si: 1.342±0.129, $p=0.03$). Conclusiones: La AR presenta alta prevalencia de VFx, mayoritariamente asintomáticas y con un elevado porcentaje de VFx múltiples. El uso del VFA y el TBS podría considerarse como un enfoque complementario a la DMO para la evaluación de la microarquitectura ósea y la presencia de fracturas en la AR.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory autoimmune disease with a high prevalence of osteoporosis and an increased risk of fractures. Aim: to evaluate bone mass and the prevalence of vertebral fractures (VFx) in patients with RA. Methods: observational cross-sectional study carried out in RA adult patients. Bone mineral density (BMD) of the lumbar spine (L1-L4) was performed with a Hologic Discovery Wi device. Bone microarchitecture was evaluated by Trabecular Bone Score (TBS iNsight). The prevalence of VFx was analyzed through lateral spine densitometry (T4-L4) by DXA (VFA, Vertebral Fracture Assessment). The difference was considered significant if $p<0.05$. Results: 84 control subjects and 89 with RA without differences in age and BMI (age= CG: 56.1±12.7; RA: 52.6±11.6 years; BMI= CG: 27.9±4.7; RA: 27.8±4.7) were

included. The RA group showed significantly lower lumbar spine BMD (1.012±0.127 vs 0.925±0.147, -8.6%; p<0.0001) and lower TBS (1.425±0.113 vs 1.340±0.126, -4.6%; p=0.0002) compared to the control group. The prevalence of VFx was significantly higher in the RA group (14.3% [12/84] vs 49.4% [44/89], OR: 5.6; p=0.0004). CG subjects with VFx (12/84) had single fractures grade I or grade II). Among RA patients with VFx (44/89), 61.4% (27/44) had single fractures (70% grade I, 30% grade II) while 38.6% had multiple fractures (2 to 4; 67% grade I, 33% grade II). Of all the fractures, only one subject (2%) presented symptomatic VFx, while the rest were asymptomatic. Subjects with VFx had significantly lower lumbar spine BMD (without VFx: 0.973±0.137, with VFx: 0.911±0.155, p=0.02) and lower TBS (without VFx: 1.389±0.111, with VFx: 1.342±0.129, p=0.03). Conclusions: RA have a high prevalence of VFx, mostly asymptomatic and with a high percentage of multiple VFx. The use of VFA and TBS could be considered as a complementary approach to BMD for the evaluation of bone microarchitecture and the presence of fractures in RA.

REFERENCIAS

1 Cooper C, Westlake S, Harvey N, Javaid K, Dennison E, Hanson M. Review: developmental origins of osteoporotic fracture. Osteoporos Int 2006; 17:337e347

2 Kralick AE, Zemel BS. Evolutionary perspectives on the developing skeleton and implications for lifelong health. Frontiers in Endocrinology 2020; 11:99.

3 Fassio A, Idolazzi L, Jaber MA, et al. The negative bone effects of the disease and of chronic corticosteroid treatment in premenopausal women affected by rheumatoid arthritis. Reumatismo 2016; 68(2):65-71.

4 Lacativa PG, Farias ML. Osteoporosis and inflammation. Arq Bras Endocrinol Metabol 2010; 54(2):123-32.

5 Gillespie MT. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. Arthritis Res Ther 2007; 9(2):103.

6 Vis M, Haavardsholm EA, Bøyesen P, et al. High incidence of vertebral and non-vertebral fractures in the OSTRA cohort study: a 5-year follow-up study in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Osteoporos Int 2011; 22:2413-9.

7 Okano T, Inui K, Tada M, et al. High frequency of vertebral fracture and low bone quality in patients with rheumatoid arthritis-Results from TOMORROW study. Mod Rheumatol 2016:1-7.

8 Cramarossa G, Urowitz MB, Su J, Gladman D, Touma Z. Prevalence and associated factors of low bone mass in adults with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2016; pii: 0961203316664597.

9 van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. Rheumatology (Oxford) 2000; 39:1383-9.

10 Shimizu T, Cruz A, Tanaka M, Mamoto K, Pedoia V, Burghardt AJ, Heilmeier U, Link TM, Graf J, Imboden JB, Li X. Structural Changes over a Short Period Are Associated with Functional Assessments in Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol. 2019; 46(7):676-84.

11 Di Gregorio S, Del Rio L, Rodriguez-Tolra J, Bonel E, García M, Winzenrieth R. Comparison between different bone treatments on areal bone mineral density (aBMD) and bone microarchitectural texture as assessed by the trabecular bone score (TBS). Bone. 2015; 75:138-43.

12 Harvey NC, Glüer CC, Binkley N, et al. Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice: A consensus report of a European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) Working Group. Bone 2015; 78:216-24.

13 Martineau P, Leslie WD, Johansson H, Harvey NC, McCloskey EV, Hans D, Kanis JA. In which patients does lumbar spine trabecular bone score (TBS) have the largest effect? Bone. 2018; 113:161-8.

14 Richards C, Leslie WD. Trabecular Bone Score in Rheumatic Disease. Curr Rheumatol Rep. 2022; 24(4):81-87.

15 Choi YJ, Chung YS, Suh CH, Jung JY, Kim HA. Trabecular bone score as a supplementary tool for the discrimination of osteoporotic fractures in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Medicine (Baltimore). 2017; 96(45):e8661.

16 Ulivieri FM, Silva BC, Sardanelli F, Hans D, Bilezikian JP, Caudarella R. Utility of the trabecular bone score (TBS) in secondary osteoporosis. Endocrine. 2014; 47(2):435-48.

17 Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. J Bone Miner Res. 1993; 8(9):1137-48.

18 Okano T, Inui K, Tada M, et al. High frequency of vertebral fracture and low bone quality in patients with rheumatoid arthritis-Results from TOMORROW study. Mod Rheumatol. 2017; 27(3):398-404.

19 El Maghraoui A, Rezqi A, Mounach A, Achemlal L, Bezza A, Ghozlani I. Prevalence and risk factors of vertebral fractures in women with rheumatoid arthritis using vertebral fracture assessment. Rheumatology (Oxford). 2010; 49(7):1303-10.

20 Bréban S, Briot K, Kolta S, Paternotte S, Ghazi M, Fechtenbaum J, Roux C. Identification of rheumatoid arthritis patients with vertebral fractures using bone mineral density and trabecular bone score. J Clin Densitom. 2012; 15(3): 260-6.

21 Kim D, Cho SK, Kim JY, Choi YY, Sung YK. Association between trabecular bone score and risk factors for fractures in Korean female patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2016; 26(4):540-5.

22 Kim HA, Lee HY, Jung JY, Suh CH, Chung YS, Choi YJ. Trabecular Bone Score is a useful parameter for the prediction of vertebral fractures in patients with polymyalgia rheumatica. J Clin Densitom. 2020; 23(3):373-380.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *LEISHMANIA BRASILIENSIS* Y *LEISHMANIA INFANTUM* MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL GEN *HSP70* Y POSTERIOR RFLP, EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *LEISHMANIA SPP.* DE LA REGIÓN NEA

Bettina L. Brusés, Raúl H. Lucero, Laura B. Formichelli

Instituto de Medicina Regional (UNNE)

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una de las enfermedades parasitarias de mayor impacto social y económico. Es una enfermedad endémica en más de 60 países en América Central, América del Sur, India, el Oriente Medio, el Norte de África y el Sur de Europa.

Son un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas, producidas por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*. La enfermedad es transmitida por insectos dípteros hematófagos, que corresponden a diferentes especies de flebótomos o lutzomyias, y el reservorio son animales vertebrados.

Existen más de 20 especies de parásitos identificados a nivel mundial. Las formas de éste, están relacionadas con el ciclo de vida y son dos: promastigota, forma flagelar, que se encuentra en los insectos del genero *Lutzomyia* y en cultivos y la forma amastigota (aflagelar) que se encuentra en los tejidos de hospederos vertebrados (en hombres y en animales reservorios).

La enfermedad es de severidad variable y en algunos casos cursa con lesiones que pueden llevar a la incapacidad física. Estas manifestaciones clínicas varían desde lesiones cutáneas (CL), lesiones mucocutáneas (MCL) hasta infecciones viscerales (VL) que pueden ser fatales.

Se considera que más de 350 millones de personas corren riesgo de contraer leishmaniasis y cada año se producen unos 2 millones de casos nuevos. En América Latina, CL y MCL son problemas de salud pública desatendidos. Muchas especies del subgénero *Viannia* causan la mayoría de los casos de CL, pero el MCL es causado principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

El tratamiento de la leishmaniasis es difícil y suele asociarse a efectos adversos por lo que es importante la confirmación diagnóstica pre-tratamiento. Los principales datos diagnósticos son clínicos y epidemiológicos; sin embargo, para el diagnóstico definitivo se requieren pruebas adicionales. Las principales pruebas diagnósticas son las parasitológicas, inmunológicas, histopatológicas/inmunopatológicas y moleculares. La mayoría de los métodos parasitológicos permiten aislar el parásito viable, sin embargo, son técnicamente complicados y tienen baja sensibilidad. Los métodos inmunológicos son empleados con frecuencia, pero su utilidad es limitada en áreas endémicas. Las técnicas histopatológicas/inmunopatológicas nos permiten observar el parásito y estudiar

el infiltrado inflamatorio, sin embargo, las técnicas histopatológicas tienen baja sensibilidad. Los métodos moleculares son los más sensibles y específicos y permiten identificar especies y cepas, pero su complejidad y costos limitan su aplicación rutinaria en laboratorios clínicos.

La PCR ha incrementado la sensibilidad y especificidad en la detección del parásito y combinada con las técnicas de RFLPs y RAPD facilita la diferenciación intraespecífica del parásito. La secuencia de ADN preferida para estos estudios es aquella que se encuentra en más de una copia en el genoma nuclear o del kinetoplasto.

Durante su ciclo de vida digenetic, el parásito Leishmania necesita adaptarse de la temperatura ambiental (vector) a la temperatura del mamífero-huésped (37 ° C). Como resultado, se induce la respuesta de choque térmico y se espera que las proteínas de choque térmico (HSP) desempeñen un papel importante en el proceso de adaptación, influyendo en el cambio de desarrollo de promastigotes en flebótomos a amastigotes en hospedadores mamíferos. Entre las HSP, HSP70 es la más conservada tanto en secuencia como en función. Las proteínas de la familia HSP70 son componentes centrales de muchos procesos celulares fundamentales, incluido el plegamiento y ensamblaje de proteínas recién sintetizadas, el replegamiento de proteínas agregadas y mal plegadas, la translocación de la membrana de proteínas orgánicas y secretoras, la degradación proteolítica de proteínas inestables y el control de la proteína reguladora actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se estudiaron un total de 105 pacientes. Las muestras biológicas se obtuvieron a partir de lesiones de úlceras de piel. Para esto, se extrajo la muestra de tejido circundante a la lesión con un bisturí, luego se colocó el material en un tubo Eppendorf con buffer PBS 1X estéril pH 7.2 y, de no realizar la extracción de ADN en el momento, se procedió a congelar la muestra a – 20 ºC..

Más tarde se maceró el tejido extraído y se procedió a la extracción de ADN con un Kit comercial de Roche (High Pure Template Preparation Kit) según condiciones del fabricante.

La muestra final de ADN se resuspendió en un volumen de 200 µl. de agua destilada estéril y se alicuotaron 5 µl de ADN para la cuantificación de la misma en Nanodrop para controlar la cantidad de ADN obtenido. El ADN remanente se congeló a -20ºC..

Previo a la reacción de PCR Hsp70-N, se verificó la calidad del ADN y la presencia de posibles inhibidores mediante un ensayo de PCR con un control interno de amplificación (blanco en genoma humano β-globina que produce un amplicón de 268 pb).

Para esta técnica se utilizaron primers genéricos, cuyas secuencias son:

FW F25 3´GGA CGC CGG CAC GAT TKC T-5´
Rv R617 3´-CGA AGA AGT CCG ATA CGA GGG A-5´

Luego, se preparó la mezcla de reacción según el siguiente cuadro:

REACTIVO	CC FINAL	1 REACCIÓN (µL)
Agua	-	7,25
Primer R617 100 µM	0,5 µM	0,125
Primer F25 100 µM	0,5 µM	0,125
Go Taq Green Mix 2X	1X	12,5
Templado	-	5

Las condiciones de reacción fueron: 95ºC- 3min., 40 ciclos (95ºC 40 seg. 65ºC- 1 min., 72ºC- 1 min), 72ºC- 10 min. El tamaño del producto fue de 593 pb. Los controles de PCR fueron: control positivo, ADN de cepas de referencia de *L. braziliensis* provistas por Laboratorio de Protozoología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, y control negativo de PCR con agua destilada como molde.

Una vez finalizada la PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se agregó SYBR Safe. Una vez solidificado el gel, se sembraron las muestras. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 1 hora y luego se visualizaron los productos en un transluminador UV.

Para el ensayo de RFLP se seleccionaron las muestras positivas. Se realizó la digestión de 5 µL del amplicón de interés y del control positivo.

Se preparó la mezcla de reacción según:

REACTIVO	CC FINAL	1 REACCIÓN (µL)
Agua	-	10,5
Buffer de digestión 10X	1X	2
BSA		2
Sau 3A1 10U/µL	2,5U	0,5
producto de digestión	-	5

Esta mezcla de reacción, se incubó en bloque seco a 37ºC durante 1 hora.

Posteriormente, se realizó la electroforesis en gel de agarosa para productos de RFLP. Se preparó un gel al 2,5 % en buffer TAE 1X. Se le añadió SYBR Safe. Una vez gelificado, se sembraron los productos de PCR y RFLP (sin digerir y digerido). A los productos de RFLP fue necesario agregarles un buffer de siembra. Se sembró un marcador de peso molecular de 100 pb. en ambos extremos del gel. Se realizó la corrida electroforética durante 1 hora y se visualizaron los productos en el transluminador. El patrón de corte esperado para *Leishmania braziliensis* fue de 210 pb+160 pb.

RESULTADOS

Código Muestra	PCR Convencional	Hsp70	RFLP
LB01	Detectable	Detectable	210-160
LB02	No detectable	Débil detectable	210-160
LB03	No detectable	No detectable	No detectable
LB04	Detectable	Detectable	210-160
LB05	Detectable	Detectable fuerte	210-160
LB06	No detectable	No detectable	No detectable
LB07	No detectable	Detectable	210-160
LB08	Detectable	Débil detectable	210-160
LB09	Débil detectable	Débil detectable	210-160
LB10	No detectable	No detectable	No detectable
LB11	No detectable	No detectable	No detectable
LB12	No detectable	No detectable	No detectable
LB13	No detectable	No detectable	No detectable
LB14	Detectable	Detectable	210-160
LB15	Detectable	Detectable	210-160
LB16	Detectable	Detectable	210-160
LB17	No detectable	No detectable	No detectable
LB18	Detectable	Detectable	210-160
LB19	No detectable	No detectable	No detectable
LB20	No detectable	No detectable	No detectable
LB21	Detectable	Detectable	210-160
LB22	Detectable	Detectable	210-160
LB23	Detectable	Detectable	210-160
LB24	No detectable	No detectable	No detectable
LB25	No detectable	No detectable	No detectable
LB26	No detectable	No detectable	No detectable
LB27	Detectable	Detectable	210-160
LB28	Detectable	Detectable	210-160
LB29	No detectable	No detectable	No detectable
LB30	Detectable	Detectable	210-160
LB31	No detectable	No detectable	No detectable
LB32	Detectable	Detectable	210-160

LB33	Detectable	Detectable	210-160
LB34	Detectable	Detectable	210-160
LB35	No detectable	No detectable	No detectable
LB36	Detectable	Detectable	210-160
LB37	Detectable	Detectable	210-160
LB38	No detectable	No detectable	No detectable
LB39	No detectable	No detectable	No detectable
LB40	Detectable	Detectable	210-160
LB41	No detectable	No detectable	No detectable
LB42	No detectable	No detectable	No detectable
LB43	No detectable	No detectable	No detectable
LB44	Detectable	Detectable	210-160
LB45	No detectable	No detectable	No detectable
LB46	No detectable	No detectable	No detectable
LB47	No detectable	No detectable	No detectable
LB48	Detectable	Detectable	210-160
LB49	Detectable	Detectable	210-160
LB50	Detectable	Detectable	210-160
LB51	No detectable	No detectable	No detectable
LB52	No detectable	No detectable	No detectable
LB53	No detectable	No detectable	No detectable
LB54	No detectable	No detectable	No detectable
LB55	No detectable	No detectable	No detectable
LB56	Detectable	Detectable	210-160
LB57	Detectable	Detectable	210-160
LB58	No detectable	No detectable	No detectable
LB59	No detectable	No detectable	No detectable
LB60	No detectable	No detectable	No detectable
LB61	Detectable	Detectable	210-160
LB62	Detectable	Detectable	210-160
LB63	No detectable	No detectable	No detectable
LB64	No detectable	No detectable	No detectable
LB65	No detectable	No detectable	No detectable
LB66	No detectable	No detectable	No detectable
LB67	Detectable	Detectable	210-160

LB68	Detectable	Detectable	210-160
LB69	Detectable	Detectable	210-160
LB70	No detectable	No detectable	No detectable
LB71	No detectable	No detectable	No detectable
LB72	No detectable	No detectable	No detectable
LB73	No detectable	No detectable	No detectable
LB74	Detectable	Detectable	210-160
LB75	Detectable	Detectable	210-160
LB76	No detectable	No detectable	No detectable
LB77	Detectable	Detectable	210-160
LB78	No detectable	No detectable	No detectable
LB79	Detectable	Detectable	210-160
LB80	No detectable	No detectable	No detectable
LB81	No detectable	No detectable	No detectable
LB82	No detectable	No detectable	No detectable
LB83	No detectable	No detectable	No detectable
LB84	Detectable	Detectable	210-160
LB85	Detectable	Detectable	210-160
LB86	Detectable	Detectable	210-160
LB87	No detectable	No detectable	No detectable
LB88	No detectable	No detectable	No detectable
LB89	No detectable	No detectable	No detectable
LB90	Detectable	Detectable	210-160
LB91	No detectable	No detectable	No detectable
LB92	No detectable	No detectable	No detectable
LB93	Detectable	Detectable	210-160
LB94	No detectable	No detectable	No detectable
LB95	No detectable	No detectable	No detectable
LB96	No detectable	No detectable	No detectable
LB97	Detectable	Detectable	210-160
LB98	No detectable	No detectable	No detectable
LB99	Detectable	Detectable	210-160
LB100	No detectable	No detectable	No detectable
LB101	No detectable	No detectable	No detectable
LB102	Detectable	Detectable	210-160

LB103	No detectable	No detectable	No detectable
LB104	Detectable	Detectable	210-160
LB105	Detectable	Detectable	210-160

48 muestras (45.71%) fueron detectables para *Leishmania braziliensis* mientras que 57 muestras (54.28%) fueron no detectables para el parásito.

DISCUSIÓN

Dos muestras, LB02 y LB07 dieron un resultado "no detectable" mediante la técnica de PCR convencional, mientras que en los ensayos de Hsp70 y RFLP fueron "detectables" e identificadas como *L. braziliensis*.

En ninguna de las muestras se detectó el amplicón de 210+120 pb. correspondiente a *Leishmania infantum*.

En reportes anteriores (Lugo de Yarbuh et al.) donde se utilizó esta PCR específica para *Leishmania braziliensis* (amplicón de 126 pb) se demostró que la PCR detectó infecciones verdaderas por *Leishmania* ya que fueron confirmadas por LST (Leishmanin Skin Test), en muestras de frotis o de cultivo de parásitos.

El hecho de que estos pacientes dieran positivo en LST, prueba de anticuerpos anti-Leshmania, frotis o cultivo de parásitos, era indicativo de que la PCR estaba detectando verdaderas infecciones por Leishmania en todos los pacientes.

Un reporte del año 2020 donde se describe un brote autóctono de Leishmania cutánea (CL) debido a *L. infantum* en la provincia de Corrientes (Acosta Soto L *et al*.) hace necesaria la introducción de una PCR que pueda discernir entre las especies *L. braziliensis* y *L. infantum* como productoras de Leishmania cutánea en los pacientes estudiados.

CONCLUSIÓN

El procedimiento de PCR aumentó la sensibilidad del diagnóstico por microscopía directa de CL, por lo que debe considerarse como una herramienta diagnóstica valiosa y sensible en la identificación de especies de Leishmania y en el diagnóstico de CL en los pacientes. La PCR es específica para la detección de *Leishmania braziliensis*, ya que el 98,09% de las muestras analizadas coincidieron en los resultados de PCR convencional y Hsp70. Por lo que se podría decir que esta técnica y el blanco Hsp70 presentaron una elevada especificidad para la identificación de especies de *Leishmania*.

Hsp70 resultó más sensible que la PCR específica ya que fueron confirmadas todas las muestras más dos muestras que no fueron detectadas por la PCR específica.
Todos los casos de los pacientes estudiados con leishmania cutánea que fueron confirmados por PCR se debieron a *L. braziliensis*, con lo que en este reporte no se constataron casos de Leishmania cutánea debido a *L. infantum*.

BIBLIOGRAFÍA

1- Acosta soto L, Encinas ES, Deschutter EJ, Pasetto RAL, Petri de Odriozola EMA, Boenay Linares FJ, Ramos Rincón JM. Autocthonous outbreak of Cutaneous Leishmaniasis due ti *Leishmania infantum* in Corrientes Province, Argentina. Am J Trop Med Hyg 102(3), 2002, 593-597.

2- Barrio A, Mora MC, Ramos F, Moreno S, Samson R, Basombrío MA. Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. Am J Trop Med Hyg. 2007 Oct;77(4):636-9.

3- López M, Inga R, Cangalaya M, Echevarría J, Llanos-Cuentas A, Orrego C. Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. Am J Trop Med Hyg 1993; 49: 348.

4- Lugo de Yarbuh, A, Premoli de Percoco G, Valera M. Localized cutaneous leishmaniosis using polymerase chain reaction: a Venezuelan family report. Parasitol. día vol.21 n.3-4 Santiago July 1997. http://dx.doi.org/10.4067/S0716 07201997000300001.

5- Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección de Programa de Control de Enfermedades Transmisibles. Control de Malaria y OEM. Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de Leishmaniasis en el Perú. Lima 1995:1-66..

6- Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Perú. 2000:08-83.

7- Miranda Hernán, Alfaro Armando, Lora Carmen, Rodríguez Luis; Estudio comparado de métodos de diagnóstico de la Leishmaniasis y caracterización molecular de los agentes etiológicos en la libertad. Folia Dermatol. 2003; 14 (2): 18-23.

8- Ramírez, César A., José M Requena and Concepción J Puerta. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasites & Vectors* 2011, 4:166 doi:10.1186/1756-3305-4-166. The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/166.

9- Ríos Yuil, José Manuel*; Yuil de Ríos, Emma**.** Parasitologic, immunologic, histopathologic and molecular diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. Revista Médico Científica www.revistamedicocientifica.org. 45.

10- Saiki RC, Schart S, Fladona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplifications of beta globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350.

11- Victor K, Bañuls AL, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. Parasitology 1998; 117: 1-13.

12- von Stebut E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. Exp Dermatol. 2007 Apr;16(4):340-6.

13- http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS-949_eng.pdf Control of the leishmaniases

ABSTRACT

Various characterization methods have been applied to the study of the Leishmania genus, such as isoenzyme electrophoresis, kinetoplast DNA (kDNA) analysis, random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, and molecular karyotyping. In recent years, the polymerase chain reaction, followed by restriction of the amplified product (PCR-RFLP) has become an important tool, not only for the identification, but for the characterization of species of this genus, in different geographical areas.

Recently, García and others reported the usefulness of amplification and subsequent digestion of the product of the gene that codes for the 70 kD heat shock protein of Leishmania (Hsp70), to identify several New World species, demonstrating its applicability to the study of clinical samples.

The heat- shock protein 70 gene has been exploites for *Leishmania* species identification, using PCR followes by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.
The HSP70 gene is the most common target used for the identification of Leishmania species.

In this study, we have tested the sensitivity of a specific probe such as the Hsp 70, followed by RFLP, as an alternative approach to parasitological methods to evaluate patients with cutaneous leishmaniosis (CL).

We have tasted 105 patients from different locations in the province of Corrientes and Chaco. We demostrated that the Hsp 70 followed by RFLP increased the sensibility and specificity. The combined analysis of the results reached a sensitivity of 98.13%, therefore should be considered as a valuable and sensitive diagnostic tool in the identification of species of Leishmania and in the diagnosis of CL.

TRANSMISIÓN MATERNO-INFANTIL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: BÚSQUEDA DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS EN MUJERES EMBARAZADAS CON INFECCIÓN CRÓNICA, PREDICTIVOS DEL RIESGO DE INFECCIÓN CONGÉNITA

Patricia Laura Bustos, Jacqueline Bua, Alina Perrone,
Natalia Milduberger

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben".
ANLIS "C.G. Malbrán"

ANTECEDENTES

El *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, que afecta alrededor de 8 millones de personas en América Latina. De ellas, 1.125.000 de mujeres en edad fértil tienen posibilidad de transmitir la infección por vía transplacentaria a su bebé. La vía de transmisión materno-infantil es el principal modo de persistencia de esta infección en áreas no endémicas y por migración hacia áreas no endémicas como Estados Unidos y Europa. El diagnóstico en bebés nacidos de madres infectadas por el *T. cruzi* depende de la detección de parásitos sanguíneos, único método de certeza, dado que los anticuerpos maternos se transfieren por placenta al bebé. Esto implica que si el parásito no es detectado en el neonato por microscopía o diagnóstico molecular, recién las técnicas serológicas a partir de los 10 meses de edad, confirman la infección por *T. cruzi*. Esta dinámica del diagnóstico del Chagas congénito conlleva el problema de que sólo el 40 % de los bebés que asisten al primer control completan el seguimiento para confirmar esta infección parasitaria, cuya prevalencia en nuestros estudios es del 10-11 % de las mujeres embarazadas seropositivas (Bua y col. 2013).

En nuestro laboratorio, trabajamos desde el año 2007 en diferentes aspectos de la transmisión del Chagas congénito. Determinamos que la parasitemia, cuantificada por qPCR en sangre periférica, de embarazadas que transmitieron la infección por *T. cruzi* a sus bebés era significativamente mayor a la de las embarazadas seropositivas que dieron a luz niños no infectados (Búa y col. 2012). También intentamos mejorar la sensibilidad del diagnóstico parasitológico por qPCR en 51 muestras de bebés congénitamente infectados, mostrando que al mes de vida la parasitemia de los bebés diagnosticados por microscopía fue en promedio 20 veces mayor que la de aquellos que no lograron ser diagnosticados, mientras que aquellos bebés (22/51) que sólo pudieron ser diagnosticados por serología específica alrededor del año de vida tenían una muy baja carga parasitaria, no detectable por microscopía óptica, pero sí por qPCR (Búa y col. 2013). Por otra parte, en estas muestras también estudiamos los niveles de anticuerpos contra un antígeno recombinante definido (SAPA) estableciéndose que se pueden diagnosticar por serología niños infectados por *T. cruzi* durante el primer mes de vida con un 90 % de sensibilidad si se disponen de las muestras de suero del binomio mamá-bebé recién nacido (Volta y col., 2015). Además, hemos estudiado los perfiles inmunológicos en el plasma de 35 bebés con infección congénita por *T. cruzi*, demostrando que los niveles circulantes de

las citocinas IFN-γ e IL-17A y las quimiocinas MCP-1 y MIG permiten diferenciar los neonatos infectados de los no infectados (Volta y col. 2016). En cuanto a las mujeres embarazadas, disponemos de evidencias de que existe una expresión diferencial de determinadas citocinas y quimiocinas IL-15 y TNF-α –entre otras- entre las madres que transmitieron o no la infección por *T. cruzi* a sus bebés por diferentes metodologías, antecedente que fundamenta el estudio que propusimos en el presente proyecto de investigación: **Evaluar la sensibilidad de los biomarcadores seleccionados que mejor desempeño presenten en un ensayo de ELISA de captura antigénica con el fin de desarrollar un diagnóstico predictivo de la transmisión vertical del parásito en embarazadas infectadas.**

De este modo, lograremos advertir a una mujer gestante seropositiva si tiene alta probabilidad de transmitir el parásito a su bebé, lo que facilitaría la gestión de un diagnóstico temprano de la infección en el niño recién nacido, que podría acceder al inmediato tratamiento etiológico altamente eficaz, como ya ha sido demostrado, además de contribuir a una mayor adherencia a los controles necesarios para un efectivo diagnóstico del recién nacido.

RESULTADOS

Durante la realización de este Proyecto de investigación, continuamos el reclutamiento de personas gestantes que aceptaron participar, lo que nos permitió incrementar número de muestras.

En cuanto a los mediadores inmunológicos estudiados, en los ensayos previos exploratorios, habíamos caracterizado los niveles de expresión de IFN-γ y TNF-α. Luego, ampliamos el estudio a los siguientes mediadores, característicos de distintos perfiles de respuesta inmune: IL-2, IL-4, IL5, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-γ, TNF-α, MIG, MCP-1 y RANTES. Estos mediadores fueron estudiados por una técnica que combina el inmunoensayo con citometría de flujo, mediante unas beads específicas.

Encontramos que las mujeres crónicamente infectadas con *T. cruzi*, que dieron a luz bebés sin infección, presentaban un perfil inmunológico con mayores niveles de TNF-α, IL-15 e IL-17, en conjunto con menores valores de carga parasitaria, cuantificada por la técnica de PCR cuantitativa (en promedio). En cambio, las mujeres que dieron a luz bebés con infección vertical por *T. cruzi*, presentaron mayores niveles de IL-12 y menos niveles de TNF-α, en conjunto con una mayor carga parasitaria (en promedio). Los resultados principales se encuentran sintetizados en la Tabla 2 (publicada originalmente en Volta y col., 2021). Esto nos permitió evidenciar por primera vez que existen perfiles inmunológicos diferenciales en mujeres gestantes, crónicamente infectadas por *T. cruzi*, que pueden asociarse a la transmisión vertical del parásito. Estos mediadores inmunológicos entonces podrían utilizarse como biomarcadores del resigo de la transmisión vertical.

Table 2. Univariate analysis of factors associated with *T. cruzi*-mother-to-child transmission.

Variable (unit)[a]	P+B— (n=35)	P+B+ (n=35)	value[b]
T. cruzi infection			
Parasite load (mE/mL)	***1.16 (0.22-2.22)***	***7 (1.5-14)***	***0.0001***
ELISA (O.D 450 nm)	0.336 (0.310-0.403)	0.319 (0.284-0.382)	0.5498
IHA (titer)	1/128 (1/64-1/128)	1/128 (1/128-1/128)	0.6080
Log IHA	7 (6-7)	7 (7-7)	0.6080
IIF (titer)	1/128 (1/64-1/256)	1/128 (1/128-1/256)	0.7318
Log IIF	7 (6-8)	7 (7-8)	0.7318
Cytokines (pg/mL)			
IFN-γ	31 (16.5-53)	31 (26-43.5)	0.7038
IL-12p70	***63 (39-104.5)***	***88.5 (63.25-166.5)***	***0.0105***
IL-4	16 (7-25)	8.5 (7.75-18.25)	0.3136
IL-5	16 (6-25)	15 (5.25-22.75)	0.6055
IL-17A	***9.99 (7.64-16.2)***	***7.78 (6.15-11.11)***	***0.0398***
IL-6	5.82 (4.07-7.6)	5.16 (3.86-6.04)	0.1273
IL-10	30 (22-35.5)	26.5 (23-31)	0.8411
IL-15	***37 (26.7-50.5)***	***18.5 (12.25-23.5)***	***<0.0001***
IL-1β	2.70 (1.95-4.97)	2.89 (1.77-3.47)	0.5540
TNF-α	***14 (5-54.5)***	***5 (5-17.75)***	***0.0213***
Chemokines (pg/mL)			
MCP-1	92.12 (49.31-128.26)	81.35 (41.33-120.66)	0.8374
MIG	66.85 (44.96-117.48)	100.8 (54.59-139.09)	0.1963
Ratios			
IFN-γ/IL-4	1.9 (1.1-5.1)	3 (1.22-6.02)	0.3372
IFN-γ/IL-10	1.3 (0.6-2.5)	1.05 (0.8-2.15)	0.5087
TNF-α/IL-10	***0.5 (0.2-1.85)***	***0.2 (0.2-0.65)***	***0.0121***

[a] Data for continue variables are shown as median and interquartile ranges.

[b] Italic Bold values indicate *P* values < 0.05 analyzed by the Two-Sample *t* test or the Wilcoxon Rank Sum Test as appropriate. *T. cruzi*-infected pregnant women, mothers of non-infected (P+B—) or congenitally infected babies (P+B+).

Estos hallazgos, publicados en Volta y col., 2021, nos permitieron confirmar nuestra hipótesis de trabajo y además, pudimos ampliar la búsqueda y caracterización de mediadores inmunológicos.

En una segunda etapa del proyecto, realizamos un primer abordaje de seleccionar algunos de estos mediadores inmunológicos para evaluarlos por ELISA en una nueva cohorte de pacientes y evaluar si presentan diferencias significativas que puedan distinguir entre la ocurrencia o no de la transmisión vertical. Estos resultados se encuentran en análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- **Bua J**, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. Trans R Soc Trop Med Hyg. **2012** Oct;106(10):623-8. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.015.
- **Bua J,** Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. PLoS Negl Trop Dis. **2013** Oct 17;7(10):e2476. doi: 10.1371/journal.pntd.0002476.
- **Bustos PL**, Milduberger N, Volta BJ, Perrone AE, Laucella SA, Bua J. *Trypanosoma cruzi* Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns. Front Microbiol. **2019** Jun 7;10:1250. doi: 10.3389/fmicb.2019.01250.
- **Volta** BJ, Russomando G, Bustos PL, Scollo K, De Rissio AM, Sánchez Z, Cardoni RL, Bua J. Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother-child binomial samples. Acta Trop. **2015** Jul;147:31-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.026.
- **Volta** BJ, Bustos PL, Cardoni RL, De Rissio AM, Laucella SA, Bua J. Serum Cytokines as Biomarkers of Early *Trypanosoma cruzi* infection by Congenital Exposure. J Immunol. **2016** Jun 1;196(11):4596-602. doi: 10.4049/jimmunol.1502504.
- **Volta** BJ, Bustos PL, González C, Natale MA, Perrone AE, Milduberger N, Laucella SABua J. Circulating Cytokine and Chemokine Profiles of *Trypanosoma cruzi*-Infected Women During Pregnancy and Its Association With Congenital Transmission.
- J Infect Dis. **2021** Sep 17;224(6):1086-1095. doi: 10.1093/infdis/jiab057.

ABSTRACT

Vertical transmission of *Trypanosma cruzi*: search of immunological mediators in chronically infected women, predictive of mother-to-child transmission risk

Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi,* the causative agent of Chagas disease, is the main route that generates new acute cases, when vectorial route is controlled and it is the only one present all over our country. At present, around 80% of children do not complete the diagnose of congenital Chagas disease, losing an important opportunity of medical treatment. It is of utmost importance to facilitate diagnosis. In our laboratory, we have been studying vertical Chagas disease from different aspects. We characterized parasitic load in pregnant women by qPCR, showing that higher parasitic loads are associated with vertical transmission of the parasite. We also studied serological samples of babies borned to chronically infected mothers, showing that babies without congenital infection with parasite, presented a robust imnune response with higher levels of IFN-γ, IL-6, among others. In the present project, we proposed to characterize immune mediators present in the sera of chronically-*T.cruzi* infected pregnant women, with the aim to investigate if there was an asociation with vertical transmission of the parasite. We demonstrated that women that gave birth to uninfected babies presented a more robust Th1/Th17 immune response, characterized by higher levels of Il-15, IL17 and TNF-α, together with lower parasitic loads. These differences allowed us to proposed an immune assay that would allow to predict the risk of vertical transmission of *T. cruzi*. This assay is currently under develompment.

CORONAVIRUS y METAPNEUMOVIRUS HUMANOS AUTÓCTONOS: ANÁLISIS MOLECULAR y CLÁSICO, CLÍNICA y EPIDEMIOLOGÍA EN PACIENTES DE CÓRDOBA

Alicia Cámara

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". FCM-UNC

RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA REFERIDOS A MPVH en 2011-2012

Los resultados positivos informados en el primer informe, obtenidos por Inmunofluorescencia (IFD) se confirmaron por la técnica molecular RT-PCR detectándose mayor porcentaje, siendo relevante la aplicación de las técnicas moleculares que ofrecen marcadas diferencias en las prevalencias detectadas para realizar diagnósticos más sensibles y rápidos. Estudios preliminares transcurridos entre el 2011 y 2012 por IFD la prevalencia de MPVh fue del 4% y entre 57% por RT-PCR de aproximadamente 200 muestras estudiadas en un primer momento para cada año. Si bien, nuestros resultados de prevalencias coinciden con los informes comunicados por otros autores para este virus, serían muy elevados por lo que más adelante se ajustó la técnica y se aumentó el n muestral. Posteriormente aumentando el tamaño muestral hasta ser el definitivo, en nuestra ciudad entre los años 2011 y 2012 se encontró, utilizando técnicas moleculares, una prevalencia de entre 39-47% respectivamente de los cuales entre un 20-50% se detectan en mono-infección. A partir de estos datos, MPVh se ubicó en segundo lugar, luego de Virus respiratorio sincicial (VRS) (Rodríguez et. al. 2012). Existen reportes sobre epidemiología molecular de MPVh que informan una prevalencia del 10 al 30 % en población general (Zhu et al, 2010).

Dada la importancia de MPVh como agente etiológico de patologías respiratorias humanas y considerando lo poco que se conoce sobre la caracterización biológica, epidemiológica y filogenética de este virus, es de suma necesidad profundizar en su conocimiento ya que constituye a una problemática recurrente y dinámica cada año. Por lo tanto, además de ampliar su conocimiento, también fue un gran logro su incorporación en el sistema de vigilancia sanitaria humana para conocer su circulación en la población. Además sobre la base de la literatura analizada de otros agentes causantes de infecciones respiratorias, ya que para MPVh es muy escasa, consideramos que se comporta de manera similar que el VRS, en lo que se refiere a la clínica debido a que se encuentran emparentados filogenéticamente. Este es otro objetivo a futuro, sumar el análisis epidemiológico molecular y filogenético del VRS ya que es muy importante en su prevalencia en la población infantil.

Paralelamente, investigamos a una población infantil hospitalizada en la Clínica Privada Reina Fabiola-UCC durante un período de tiempo que coincide con el pico de incidencia que se produce en agosto, septiembre, manteniéndose o disminuyendo su presencia hacia octubre y noviembre. Esperando conocer el comportamiento de MhPV en centros de salud privado de Córdoba, se planteó investigar la circulación de este virus respiratorio por la

técnica RT-PC y promover el diagnóstico molecular a nivel estatal. Se detectó la circulación del agente MPVh en población infantil de Córdoba. De las 65 muestras totales analizadas del año 2012, 60 fueron positivas por RT-PCR, dando una elevada prevalencia que supera los reportes consultados. La búsqueda fue en dos períodos de mayo a agosto y de noviembre a diciembre, observándose un mayor número de casos en Junio (21 del total de 45). Se detectó infección viral respiratoria previamente por IFD en 34 pacientes con 31 positivos para VRS. La mayoría de los niños tenían 2 años (n=24) siguiendo los de 1 año (n=15). No hubo diferencia a nivel del género. Finalmente, si bien el estudio fue parcial, ya que faltan datos, nos permite igualmente afirmar la circulación de MPVh en esta Clínica Privada de Córdoba, donde asisten niños con las necesidades básicas satisfechas y protegidos inmunológicamente. Por lo que se puede colegir que su circulación está determinada por otros factores como la estacionalidad que lleva al comportamiento de hacinamiento en nosocomios, cines, shopping, escuelas, fábricas, oficinas, etc., favoreciendo el acercamiento social que promueve el contagio y la transmisión.

Inferimos que la elevada prevalencia puede deberse a que el muestreo fue principalmente en el pico de mayor frecuencia de casos de MPVh. Si el muestreo hubiera sido uniforme a lo largo del año, quizá los negativos obtenidos de meses no muestreados, bajarían la prevalencia a valores reportados por la bibliografía. Pero también hay que tener en cuenta que en un nosocomio el diagnóstico se hace a demanda y este período fue el más solicitado. Debido al cuadro clínico podemos afirmar que los niños estaban transitando la infección o ya la habían pasado. Estos resultados fueron presentados en dos comunicaciones en el Congreso Argentino de Microbiología 2015 (CAM 2015). Argentino e Internacional en Buenos Aires, Argentina.

CORONAVIRUS, 229E Y OC43, EN PACIENTES DE CÓRDOBA EN LOS AÑOS 2011-2012.

Este tema se investigó para la realización de la tesis de grado de la estudiante de biología María Emilia Ottogalli. Colaboraron ampliamente Pamela E. Rodríguez, María Celia Frutos; Laura B. Moreno, Lucía María Ghietto, María Pilar Adamo, Cecilia G. Cuffini, Jorge A. Cámara, Laura Valinotto y Alicia Cámara como directora de Tesis de grado para optar al título de Bióloga en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la UNC. Fue aprobado con Sobresaliente. Las infecciones respiratorias agudas (IRA), frecuente causa de morbilidad y mortalidad en todas las edades. Hace 18 años, una de las más importantes epidemias fue producida por SARS-HCoV en 2002. Entonces, se intensificaron los estudios sobre Coronavirus (HCoV) que comenzaba a tener relevancia para la salud del hombre causando enfermedades respiratorias, entéricas, cardiovasculares y desórdenes neurológicos. Los síntomas son resfrío común, rinitis, infecciones pulmonares e hiperactividad bronquial. Los HCoV están distribuidos mundialmente, la prevalencia, la distribución regional y patogenicidad de cada especie es poco clara. En Argentina, sólo reportó Maffey quien detectó en pacientes IRA en Buenos Aires con una prevalencia del 2%.

El propósito de esta investigación fue conocer la prevalencia del agente Coronavirus (HCoV-229E y HCoV-OC43) a través del análisis molecular en paciente con infecciones respiratorias en los años 2011- 2012 en la ciudad de Córdoba. Las muestras fueron de hospitales públicos y privados, tanto de Córdoba capital como del interior y hubo muestras de diferentes edades desde recién nacidos hasta adultos todos hospitalizados. Se

utilizó la técnica molecular RT-PCR de un solo paso en 631 secreciones nasofaríngeas de pacientes con IRA (0-65 años) internados en centros de salud de Córdoba en el año 2011 y 2012 siguiendo el protocolo de Vabret et al. (2001), con primers para el gen de la proteína M de ambas especies. Para el año 2011 se encontró HCoV-229E con una prevalencia de 0,8% (3/375) y HCoV-OC43 con 2,42% (9/375). Para el año 2012, HCoV-229E se detectó en un 0,78% (2/256) y HCoV-OC43 1,96% (5/256) no encontrándose diferencias significativas en la circulación de las especies para ambos años. Referido a los rangos etarios, se encontró a HCoV-229E en todas las edades. En el caso de HCoV-OC43 sólo en niños hasta 6 años. No hubo diferencias significativas entre varones y mujeres. Sólo se encontró asociación de una de las especies (HCoV-229E) con asma, en el año 2011 teniendo en cuenta todas las manifestaciones clínicas. Por otro lado HCoV-229E se encontró 80% en mono-infección y en un 20% en co-infección con MPVh. Para HCoV-OC43 un 28,57% en mono-infección, en co-infección con RSV 28,57%, con MPVh 14,28%, Flu A 7,14%. En triple infección se presentó con MPVh y RSV 14,28% y MPVh y Flu B 7,14%. No se encuentran diferencias significativas entre los casos de pacientes con HCoV provenientes de clínicas públicas y privadas para ninguno de los dos años estudiados. Concluimos que son los primeros hallazgos de HCoV en Córdoba, siendo importante las mono-infecciones. Los datos fueron comparables a los obtenidos por Vabret en 2001 en Francia (3%) y Maffey en 2008 en Argentina (2%). De las infecciones causadas por Coronavirus en humanos, la mayoría son leves, pero a partir de los brotes causados por SARS-CoV (2002) y MERS-CoV (2012) demostró ser capaz de causar enfermedades severas incluso fatales. **Y al enviar este informe estamos con la crítica pandemia provocada por el SARS CoV-2 que produce el COVID-19 y que tan ocupados y preocupados nos tiene.** Por ello conocer su prevalencia y epidemiología resulta de utilidad a fin de implementar estrategias de prevención y tratamiento destinadas a disminuir la morbilidad y mortalidad que ocasionan. Estos resultados fueron presentados en Congresos Argentinos de Microbiología o Virología CAM o CAV y en Jorndas JIC 2013-14-15 y 16. Además de otras Reuniones Científicas. Dificultades encontradas en la Investigación: En las investigaciones en virosis respiratorias siempre tenemos alta demanda en fechas picos desde abril hasta septiembre. Se vuelve difícil mantener las cantidades de reactivos y el recurso humanos. Se atrasa la presentación de informes.

ESTRATEGIAS DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA GENERADAS A PARTIR DE INVESTIGACIONES SOBRE PREVENCIÓN SANITARIA RELACIONADA A MPVH Y HCOV OC43 Y 229E HACIA LA COMUNIDAD DURANTE 2014-2015.

La extensión pretende ser singular y diferenciada de las actividades de docencia e investigación, pero a su vez articula con ambas ya que todas involucran el proceso de enseñanza y Aprendizaje (E-A). Se piensa a la extensión como una acción interdisciplinaria cuyo objetivo está centrado en abordar integralmente, junto a la comunidad, problemas o temas que se perciben como relevantes. La vinculación tiene como propósito principal el encuentro con otros, en relación de pares sociales con la intención de un mutuo enriquecimiento. Cuando se consideró que las plagas que afectaban a la sociedad estaban controladas, se pensó que el problema estaba resuelto. Sin embargo la realidad fue más compleja.

Los virus constituyen una de las etiologías más importantes de las enfermedades infecciosas humanas, el concepto general de las enfermedades infecciosas ha

experimentado un cambio radical en las tres últimas décadas. Los conocimientos acerca del agente causal y su terapéutica, no fueron suficientes para controlar la difusión del patógeno en la comunidad. Así, el agente es considerado un factor necesario pero no el único responsable del proceso infeccioso. Otros factores relacionados al huésped y al medio ambiente adquirieron tal importancia como para ser considerados también factores etiológicos. Este Proyecto se llevó a cabo con alumnos y docentes de los 6 ° años de Ciencias Naturales del IPEM 38 Francisco Pablo de Mauro; del IPEM 40 "Deodoro Roca", instituciones públicas y Colegio Sarmiento (privado) que dependen del Ministerio de Educación, todos de jurisdicción provincial de Córdoba y el Liceo Militar General Paz dependiente del Ministerio de Defensa (Nación).

Propósitos:

-Acortar la distancia existente entre el último año de la secundaria con la Universidad vinculando los alumnos mediante el conocimiento y la prevención sanitaria.

-Acercarlos a la vivencia universitaria referido a las tradiciones y costumbres, relaciones interpersonales, valores, tiempos y lugares.

Contenidos y Actividades: segunda semana de junio de 2014-15.

¿Qué son las infecciones virales respiratorias? ¿Cómo se clasifican? ¿Cómo se estudian? Propiedades virales y Patogénesis, Relación Virus-Célula. Infección-Enfermedad. Actividad grupal: A) Resolución de crucigramas de palabras claves, Vacunas. Antivirales. Tipos. Refuerzos. B) Análisis de la cartilla de vacunación.

¿Cómo se investiga un virus? Diagnóstico Directo e indirecto. Neutralización (NT), Inmunofluorescencia (IF), etc. Interpretación y Análisis de resultados de las Pruebas.

Mostración: Descripción y Explicación de todos los aparatos, equipos e insumos utilizados. Observación de imágenes de a) Virus en el microscopio. b) cambios en animales infectados. c) efectos citopático (ECP) en cultivos celulares. Observación de portaobjetos. Fotos, placas. Videos. Integración multidisciplinar.

Bioseguridad y esterilización. Conductas Preventivas. Prevención primaria, secundaria y terciaria. Modelos Virales: Influenza, Respiratorio Sincicial, Metapneumovirus humano, Coronavirus, Para-Influenza y Adenovirus. Laboratorios de Riesgo I, II y III.

Juego de roles. Actividades y estrategias creativas. Seguimiento actitudinal. Desarrollo de competencias comportamentales. Pautas desde la educación para la salud. Derechos y obligaciones como ciudadanos hacia una vida sana para nosotros y los demás. Algoritmo a seguir ante una infección. Reflexión y concientización.

Metodología:

La modalidad de trabajo elegida fue el aula taller, ésta pone el eje en la participación de todos los protagonistas en el proceso de enseñanza y aprendizaje. El aula-taller tradicional y el aula-taller al sol, se convierten en un espacio en que todos son artesanos del conocimiento y desarrollan instrumentos para abordar el objeto, de manera que todos se reconozcan en el producto final de la tarea. Se establece un circuito dialogado entre todos los participantes de la clase. Se estimula la construcción grupal de conceptos partiendo de ideas previas. Luego se mantiene el diálogo reflexionando acerca de interrogantes planteados. Esta modalidad incluye instancias individuales y grupales. En el caso de la primera posibilita la reflexión personal y discusión con lo que cada alumno sabe, con sus dudas, conocimientos alternativos, entre otros aspectos. En cuanto a lo grupal es un

trabajo que se hace con otros, caracterizado por la cooperación y la tolerancia. Finalmente Aula también por las clases expositivas, teóricos, charlas dialogadas y Taller por aprender haciendo o aproximando al educando al trabajo científico. Se realizaron reuniones entre las instituciones participantes para acordar modalidades de trabajo, cronogramas, exigencias del seguro de vida para alumnos y docentes.

Evaluación de los alumnos:

Presentación de una producción final en forma grupal intra-escolar. Facilitación y fortalecimiento del feed-back comunicacional entre los alumnos y los docentes. La evaluación continua y el seguimiento es a través del registro de las observaciones, de la participación de los alumnos, las intervenciones oportunas, las respuestas adecuadas, etc. Encuestas para alumnos. También se hace el seguimiento y ajuste de las actividades a través de las clases dictadas para mejorar las prácticas hacia futuros encuentros. Se valora la solidaridad, compañerismo, respeto, el espíritu crítico y aceptación de la opinión del otro. Como resultado final se presenta a Jornadas y Congresos.

Seguimiento y evaluación del proyecto. Autoevaluación y Co-evaluación:

Cumplimiento en tiempo y forma de las consignas. Desarrollar los contenidos, según los objetivos planteados con las actividades correspondientes. Mantener la coherencia interna durante todo el proceso de E-A. Aportaciones claras y explicativas atendiendo a los requerimientos de los alumnos. Registro de actividades. Ajustes, Recopilación de experiencias. Registros anecdóticos de la tarea docente, mostración e investigación. Facilitar y fortalecer el feedback comunicacional entre los alumnos y los docentes. Observación de la participación, actitud, colaboración, aportaciones individuales y grupales docentes, coordinadores por medio de grillas elaboradas por los docentes. Encuesta para docentes.

Resultados logrados y esperados…:

En primer lugar se espera que estas actividades continúen y puedan permitir a los alumnos secundarios continuar estudios superiores. También promover hábitos y conductas saludables, prevenir enfermedades, especialmente referidos a las infecciones respiratorias y en general. Resolver problemas de salud y capacitarlos desde edades tempranas para abordar problemas con una perspectiva crítica, social y transformadora (Pérez Monroy, 2007). Del Seguimiento de todos los integrantes del Proyecto se obtienen resultados que son presentados a distintos eventos para su comunicación. Se presentan Resúmenes, Publicación en Jornadas y Revistas. En 2013 se ha publicado en la Revista EXT digital de la UNC. En 2014 el texto dado a conocer en el compendio “AAEA. ARTE y EDUCACIÓN-2014”, que recupera las expresiones artísticas surgidas en el seno de la experiencia como estrategias para investigar, conocer y prevenir en salud. En 2015 se publicó en una Colección de Educación Secundaria: Sentidos, contextos y desafíos. “Experiencias Pedagógicas en Educación Secundaria. Significantes y Significados" 2015, UNICEF-CONICET y UCC. Finalmente es relevante el aporte que se hace desde estas investigaciones con la biología molecular, detección, prevalencia, estacionalidad y filogenia para contribuir al diagnóstico diferencial de Metapneumovirus y Coronavirus se incluya en la detección de rutina de Respiratorios. Su divulgación a través de la extensión brindará hábitos desde la educación para la salud para favorecer su prevención comunitaria.

RESUMEN

En nuestra ciudad entre los años 2011 y 2012 se propuso investigar la circulación de Metapneumovirus humano (MPVh) en el Hospital de Niños provincial y se encontró utilizando técnicas moleculares, una prevalencia de entre 39-47% respectivamente de los cuales entre un 20-50% se detectan en mono-infección. A partir de estos datos, MPVh se ubicó en segundo lugar, luego de Virus respiratorio sincicial (VRS) (Rodríguez et. al. 2012). Existen reportes sobre epidemiología molecular de MPVh que informan una prevalencia del 10 al 30 % en población general (Zhu et al, 2010). Paralelamente, investigamos a una población infantil hospitalizada en la Clínica Privada Reina Fabiola-UCC durante un período de tiempo que coincide con el pico de incidencia que se produce en agosto, septiembre, manteniéndose o disminuyendo su presencia hacia octubre y noviembre. De las 65 muestras pediátricas totales analizadas del año 2012, 60 fueron positivas por RT-PCR, dando una elevada prevalencia que supera los reportes consultados. Se detectó infección viral respiratoria previamente por IFD en 34 pacientes con 31 positivos para VRS. La mayoría de los niños tenían 2 años (n=24) siguiendo los de 1 año (n=15).

Otro propósito de esta investigación fue conocer la prevalencia del agente Coronavirus (HCoV-229E y HCoV-OC43) a través del análisis molecular en paciente con infecciones respiratorias en los años 2011- 2012 en la ciudad de Córdoba. Las muestras fueron de hospitales públicos y privados, tanto de Córdoba capital como del interior y hubo muestras de diferentes edades desde recién nacidos hasta adultos todos hospitalizados. Se utilizó la técnica molecular RT-PCR de un solo paso en 631 secreciones nasofaríngeas de pacientes con IRA (0-65 años) internados en centros de salud de Córdoba en el año 2011 y 2012 siguiendo el protocolo de Vabret et al. (2001), con primers para el gen de la proteína M de ambas especies. Para el año 2011 se encontró HCoV-229E con una prevalencia de 0,8% (3/375) y HCoV-OC43 con 2,42% (9/375). Para el año 2012, HCoV-229E se detectó en un 0,78% (2/256) y HCoV-OC43 1,96% (5/256) no encontrándose diferencias significativas en la circulación de las especies para ambos años. Concluimos que son los primeros hallazgos de HCoV en Córdoba, siendo muy importante por las mono-infecciones. Los datos fueron comparables a los obtenidos por Vabret en 2001 en Francia (3%) y Maffey en 2008 en Argentina (2%). De las infecciones causadas por Coronavirus en humanos, la mayoría son leves, pero a partir de los brotes causados por SARS-CoV (2002) y MERS-CoV (2012) demostró ser capaz de causar enfermedades severas incluso fatales. Y al enviar este informe estamos con la crítica pandemia provocada por el SARS CoV-2 que produce el COVID-19 y que tan ocupados y preocupados nos tiene. Por ello conocer su prevalencia y epidemiología resulta de utilidad a fin de implementar estrategias de prevención y tratamiento destinadas a disminuir la morbilidad y mortalidad que ocasionan. Estos resultados fueron presentados en Congresos Argentinos de Microbiología o Virología CAM o CAV y en Jorndas JIC 2013-14-15 y 16. Además de otras Reuniones Científicas.

La extensión universitaria pretende ser singular y diferenciada de las actividades de docencia e investigación, pero a su vez articula con ambas ya que todas involucran el proceso de enseñanza y Aprendizaje (E-A). Los propósitos son -Acortar la distancia existente entre el último año de la secundaria con la Universidad vinculando los alumnos mediante el conocimiento y la prevención sanitaria. -Acercarlos a la vivencia universitaria referido a las tradiciones y costumbres, relaciones interpersonales, valores, tiempos y lugares. Con respecto a la extensión se espera que estas actividades continúen y puedan permitir a los alumnos secundarios continuar estudios superiores. También promover

hábitos y conductas saludables, prevenir enfermedades, especialmente referidos a las infecciones respiratorias y en general. Resolver problemas de salud y capacitarlos desde edades tempranas para abordar problemas con una perspectiva crítica, social y transformadora (Pérez Monroy, 2007). Se presentan Resúmenes, Publicación en Jornadas y Revistas. En 2013 se ha publicado en la Revista EXT digital de la UNC. En 2014 el texto dado a conocer en el compendio "AAEA. ARTE y EDUCACIÓN-2014", que recupera las expresiones artísticas surgidas en el seno de la experiencia como estrategias para investigar, conocer y prevenir en salud. En 2015 se publicó en una Colección de Educación Secundaria: Sentidos, contextos y desafíos. "Experiencias Pedagógicas en Educación Secundaria. Significantes y Significados" 2015, UNICEF-CONICET y UCC.

ABSTRACT

In our city between 2011 and 2012, we proposed to investigate the circulation of Human Metapneumovirus (MPVh) at the Provincial Children's Hospital and it was found using molecular techniques, a prevalence of between 39-47% respectively of which between 20-50 % are detected in mono-infection. From these data, MPVh ranked second, after Respiratory Syncytial Virus (RSV) (Rodríguez et al., 2012). There are reports on the molecular epidemiology of MPVh that report a prevalence of 10 to 30% in the general population (Zhu et al, 2010). At the same time, we investigated a child population hospitalized at the Reina Fabiola-UCC Private Clinic for a period of time that coincides with the peak incidence that occurs in August, September, maintaining or decreasing its presence towards October and November. Of the 65 total pediatric samples analyzed in 2012, 60 were positive by RT-PCR, giving a high prevalence that exceeds the reports consulted. Respiratory viral infection by IFD was previously detected in 34 patients with 31 positive for RSV. Most of the children were 2 years old (n = 24) following those of 1 year (n = 15).

Another purpose of this research was to find out the prevalence of the Coronavirus agent (HCoV-229E and HCoV-OC43) through molecular analysis in a patient with respiratory infections in the years 2011-2012 in the city of Córdoba. The samples were from public and private hospitals, both in Córdoba and the interior, and there were samples of different ages from newborns to adults, all hospitalized. The single-pass molecular RT-PCR technique was used in 631 nasopharyngeal secretions from patients with AKI (0-65 years) admitted to health centers in Córdoba in 2011 and 2012, following the protocol of Vabret et al. (2001), with primers for the M protein gene of both species. For the year 2011, HCoV-229E was found with a prevalence of 0.8% (3/375) and HCoV-OC43 with 2.42% (9/375). For the year 2012, HCoV-229E was detected in 0.78% (2/256) and HCoV-OC43 1.96% (5/256), not finding significant differences in the circulation of the species for both years. We conclude that these are the first HCoV findings in Córdoba, being very important due to mono-infections. The data was comparable to that obtained by Vabret in 2001 in France (3%) and Maffey in 2008 in Argentina (2%). Of the infections caused by Coronavirus in humans, most are mild, but from the outbreaks caused by SARS-CoV (2002) and MERS-CoV (2012), it was shown to be capable of causing severe and even fatal diseases. And when sending this report we are with the critical pandemic caused by the SARS CoV-2 produced by COVID-19 and how busy and concerned it has us. Therefore, knowing its prevalence and epidemiology is useful in order to implement prevention and treatment strategies aimed at reducing the morbidity and mortality they cause. These results were presented at Argentine Congresses of Microbiology or Virology

CAM or CAV and Jorndas JIC 2013-14-15 and 16. In addition to other Scientific Meetings.

The university extension aims to be unique and differentiated from teaching and research activities, but in turn articulates with both since they all involve the teaching and learning process (E-A). The purposes are -To shorten the distance between the last year of high school and the University, linking students through knowledge and health prevention. - Get them closer to the university experience referring to traditions and customs, interpersonal relationships, values, times and places. Regarding extension, these activities are expected to continue and may allow secondary students to continue higher studies. Also promote healthy habits and behaviors, prevent diseases, especially those related to respiratory infections and in general. Solve health problems and train them from an early age to tackle problems with a critical, social and transformative perspective (Pérez Monroy, 2007). Abstracts, Publication in Conferences and Magazines are presented. In 2013 it was published in UNC's EXT digital magazine. Abstracts, Publication in Conferences and Magazines are presented. In 2013 it was published in UNC's EXT digital magazine. In 2014 the text released in the compendium "AAEA. ART and EDUCATION-2014", which recovers the artistic expressions that emerged from the experience as strategies for investigating, knowing and preventing health. In 2015 it was published in a Secondary Education Collection: Senses, contexts and challenges. "Pedagogical Experiences in Secondary Education. Significants and Meanings "2015, UNICEF-CONICET and UCC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Boivin, G., Mackay, I., Sloots, T. et al. 2004. "Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene." Emerg. Infect. Dis. 10: 1154-1157.

2-Bouscambert-Duchamp, M., Lina, B.; Trompette, A. et el. 2005. "Detection of Human Metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronquiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phyligenetic analysis". J.Clin.Microbiol. Vol: 43. Nº 3. p. 1411-1414.

3-Broor, S., Bharaj, P. and Chahar, H. 2008. "Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen." J. Biosci. 33(4): 483-493.

4-Galiano M., Trento A., Ver L. et al 2006 "Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human Metapneumovirus strains". - J Med Virol. May; 78(5):631-7.

5-Lo Presti, A., Cammarota, R., Apostoli, P. et al. 2011. "Genetic variability and circulation pattern of human metapneumovirus isolated in Italy over five epidemic seasons". New Microbiologica. 34: 337-344.

6-Lozano, J., Yáñez, L., Lapadula, M. et al. 2009. "Infección por Metapneumovirus humano en niños hospitalizados por una enfermedad respiratoria aguda grave: descripción clínico-epidemiológico." Rev Chil Enf Respir. 25:211-217.

7-Luchetti E. 2005. Articulación. Editorial Bonum. Buenos Aires.

8-Maffey, A., Venialgo, C., Barrero, P. et al. 2008. "Nuevos virus respiratorios en niños de 2 meses a 3 años con sibilancias recurrentes." Archivo Argentino de Pediatría. 106(4):302-309.

9-Rodríguez, P.E., Cámara, A. 2012. “Caracterización epidemiológica de Metapneumovirus humano y su relación con otros agentes causantes de infección respiratoria en población infantil de la ciudad de Córdoba”. Tesina de grado. Hemeroteca de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

10-Rodríguez, P.E., Cámara J. A., Cámara, A. 2012. “First detection of human Metapneumovirus, acute respiratory infection agent, in a child hospitalized of Córdoba, Argentina, during 2011”. Scientific Journal of Microbiology. 1(5) 133-135.

11-Thammawat, S., Sadlon, T., Hallsworth, P. et al. 2008. “Role of Cellular glycosaminoglycans and changed regions of viral G protein in human Metapneumovirus Infection.” Journal of Virology. Vol. 82, No. 23 , p. 11767–11774.

12-Van den Hoogen, B., de Jong, J., Groen, J. et al. 2001. “A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease”. Nat Med. 7(6):719-24.

13-Van den Hoogen, B., Herfst, S., Sprong, L. et al. 2004. “Antigenic and genetic variability of human metapneumovirus” Emerg. Infect. Dis. 10: 658-666.

14-Velez Rueda AJ, Mistchenko AS, Viegas M. 2013. “Phylogenetic and phylodynamic analyses of human metapneumovirus in Buenos Aires (Argentina) for a three-year period (2009-2011)”. PLoS One. Apr 30;8(4):e63070.

15-Zhu, R., Quian, Y., Zhao, L. et al. 2011. “Caracterization of human metapneumovirus from pediatric patients with acute respiratory infections in a 4-year period in Beijing, China.” Chinese Medical Journal. 124 (11):1623-1628.

16- Pamela Elizabeth Rodríguez, María Pilar Adamo, María Gabriela Paglini, Laura Moreno, Jorge Augusto Cámara y Alicia Cámara. “Mono-infecciones de Metapneumovirus humano en Córdoba: primeras investigaciones clínico-epidemiológicas en niños con infección respiratoria en 2011”. Revista Facultad de Ciencias Médicas- UNC. Aceptado en Edición. 2016.

17-Alicia Cámara, Marcela Lúchese, María de Lourdes Novella, Ruth Fernández, Marta Benítez y Gerardo R. Theiler. “Articulación Educativa entre la Universidad y la Secundaria abordada desde la Virología”. Revista EXTENSION. Secretaría de Extensión Universitaria, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2014. N° 5 – Pág: 1-13. http://revistas.unc.edu.ar/index.php/ext.

18-Cámara A; Benítez, M; Augello M; Balangero M; Theiler G; “Expresiones Artísticas para aprender y promover la Educación para la Salud”. 14 de Junio de 2013. Encuentro de Arte y Educación. Ciudad de las Artes. Memorias del encuentro. Editorial AAEA.

19-Ghietto LM, Majul D, Ferreyra Soaje P, Baumeister E, Avaro M, Insfrán C, Mosca L, Cámara A, Moreno LB, Adamo MP. “Co-morbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory human bocavirus infection”. Archives of Virology 160: 117–127 (2015). DOI 10.1007/s00705-014-2238-5. ISSN: 0304-8608 (Print) 1432-8798 (Online).

20-Publicación Colección Educación Secundaria: “Estudio eco-epidemiológico del Dengue. Una experiencia de Articulación entre el Nivel Secundario y la Universidad Nacional de Córdoba”. Alicia Cámara, Gerardo Theiler, Marta Benítez y Marysol Augello. 2015. En Colección Educación Secundaria; Sentidos, Contextos y Desafíos. Experiencias Pedagógicas en Educación Secundaria: Significantes y Significados. Pag 38 a 45. Publicación subvencionada con aportes de Fondo de Naciones Unidas (UNICEF),

la Facultad de Educación (Equipo de Investigación de Educación de Adolescentes y Jóvenes-Unidad Asociada CONICET) y la Editorial de la Universidad Católica de Córdoba. Archivo Digital: descarga online: C:Users/pc/Downloads/EP%20SyS%20web%20(4).pdf ISBN 978-987-626-298-9.serie.

21-Comunicaciones en Jornadas cientificas, educación y extensión. -Rodríguez PE., Frutos MC., Cuffini C., Cámara JA., Cámara A. "Nuevos aportes al estudio filogenético de Metapneumovirus humano en Córdoba, Argentina". XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba capital, Argentina. 14-16 de septiembre de 2014.-.

22-Nasi Medeot L., Frutos M., Rodríguez P., Tenaglia M., Cuffini C., Isa M., Cámara A. "Detección de Metapneumovirus humano en población infantil de un centro de salud privado de Córdoba". XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba capital, Argentina. 14-16 de septiembre de 2014.-.

23-Rodríguez PE., Gil PI., Cámara JA., Paglini MG., Cámara A. "Evidencias de Metapneumovirus humano autóctono en cultivo celular". XV Jornadas de investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas. Córdoba capital, Argentina. 24 de octubre de 2014. PREMIADO COMO MEJOR TRABAJO DE JOVEN INVESTIGADOR.

24-2015-Ottogalli, ME; Rodríguez, PE; Frutos MC; Moreno, L; Cuffini CG; ValinottoL; Cámara, JA y Cámara, A. Ajustes Metodológicos: Investigación de Coronavirus por Técnicas Moleculares en Córdoba. 3ª Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Tucumán, Argentina, Septiembre 2015.

25-2015-Pamela, E; Rodríguez, J; Cámara, JA; Cámara, A. Epidemiología Molecular de Metapneumovirus Humano en Niños y Adultos Internados por Infección Respiratoria Aguda Durante el Año 2012 en Córdoba, Argentina". Laboratorio de Virus Influenza y otros Virus Respiratorios. Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. UNC, Argentina. XI Congreso Argentino de Virología. II Congreso Latinoamericano de Virología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 23 al 26 de junio de 2015.

26-2015-Ottogalli, ME; Rodríguez, PE; Frutos, MC; Moreno, C; Cuffini, CG; Valinotto; Cámara, JA y Cámara, A. "Análisis Molecular de Coronavirus en pacientes con Enfermedades Respiratorias, en la Ciudad de Córdoba". Laboratorio de Virus Influenza y otros Virus Respiratorios. InViV. FCM. UNC. XVI Jornadas de Investigación Científica en Medicina – Organizadas por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC. Córdoba, Argentina, 28 de Octubre de 2015. Salón de Graduados. FCM Ciudad Universitaria.

DIAGNÓSTICO DEL ESTADO DE SALUD EN LA LOCALIDAD DE RAWSON PARTIDO DE CHACABUCO, PROV. DE BUENOS AIRES

Roberto Chuit

Institución: Instituto de Investigaciones Epidemiológicas.
Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

De modo general, las intervenciones comunitarias han sido más exitosas en influir sobre la percepción pública de los problemas de las personas si se basan en el conocimiento adecuado y la aceptación que la comunidad tiene sobre la salud y el sistema de salud.

El enfoque comunitario incluye problemas individuales dentro del contexto más amplio, siendo necesario reconocer que las comunidades comprenden ambientes sociopolíticos extensos, donde puede ocurrir que algunas intervenciones que en una comunidad son efectivas, pueden no serlo en otras, poniendo en evidencia la necesidad de una adecuación local de las actividades y metas que se establezcan.

Es razonable plantear que la efectividad de un enfoque integral debería tener un mayor impacto en cambios poblacionales respecto a su visión de la salud.

Ningún riesgo existe de forma aislada. Muchos tienen su raíz en complejas cadenas de acontecimientos que abarcan largos periodos de tiempo. Cada uno de ellos tiene una causalidad única o múltiple. Por ejemplo, diferentes estudios muestran una relación directa entre el hábito de fumar, el consumo de alcohol, el sedentarismo, la ansiedad y los malos hábitos alimenticios. El sobrepeso y la obesidad son problemas que aumentan el riesgo de padecer diversas enfermedades, los cuales se encuentran asociados principalmente a malos hábitos e inactividad física constituyéndose en factor de riesgo para padecer otras enfermedades crónicas.

La complejidad para evaluar iniciativas basadas en la comunidad ha significado que muy pocas de esas intervenciones hayan sido evaluadas rigurosamente y con indicadores que permitan hacer un seguimiento sobre su impacto en la salud de cada uno de los individuos El presente trabajo busca recopilar información y su análisis para desarrollar acciones de promoción de la salud y prevención de factores de riesgo, tratamiento adecuado de las enfermedades detectadas y evaluar su impacto en una primera etapa de implementación de diagnóstico de situación y conocimiento de condicionantes para sí proponer acciones y/o intervenciones, para posteriormente efectuar evaluaciones cada 5 años, vía los instrumentos que han sido utilizados en la implementación del proyecto.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar el diagnóstico del estado de salud en la localidad de Rawson, Partido de Chacabuco, Provincia de Buenos Aires con el objeto de establecer una línea de base que permita evaluar intervenciones de promoción de la salud, prevención de factores de riesgo y enfermedades comunitarias para la mejora del estado de salud de la población en un seguimiento de 5 años.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

A. DESARROLLADOS EN BASE AL PRESENTE PROYECTO

1. Caracterizar determinantes de la salud en lo social, lo cultural, y económico para colaborar en el desarrollo integral de la comunidad de Rawson.
2. Analizar el estado de salud y morbilidad de la población de Rawson.
3. Evaluar barreras y facilitadores para el acceso al sistema de salud de los habitantes de Rawson.
4. Lograr una visión integral de la salud en los integrantes del equipo de salud.

B. PARA SER EVALUADO

- Intervenir sobre las alteraciones de salud – enfermedad, de forma longitudinal durante un lapso mínimo de 5 años, llevando u registro detallado de las acciones implementadas y los resultados alcanzados comparados con los relevamientos de base.

METODOS Y PROCEDIMIENTOS

A.1.- CARACTERIZAR DETERMINANTES DE LA SALUD EN LO SOCIAL, LO CULTURAL, Y ECONÓMICO PARA COLABORAR EN EL DESARROLLO INTEGRAL DE LA COMUNIDAD DE RAWSON.

Para el relevamiento de datos de la población de Rawson se desarrolló **ENCUESTA** diferenciada en 2 componentes:

- SALUD
- SOBRE ADICCIONES Y SEXUALIDAD

Esta primera fase se efectuó mediante encuestas a la población de mayores de 16 años, sin identificación personal, y que aceptó voluntariamente contestar la encuesta utilizando dos mecanismos diferenciados:

- *ENCUESTA SOBRE SALUD*, efectuada por encuestador capacitado, identificado como miembro del equipo de salud del Partido de Chacabuco y oriundo de la localidad que concurrió al domicilio. La encuesta no relevó datos sensibles y los datos recabados estuvieron enfocados a hábitos personales, percepciones de su estado de la salud y de los servicios ofrecidos a la comunidad por el sistema de salud.
- *ENCUESTA SOBRE ADICCIONES Y SEXUALIDAD*. Esta encuesta es auto-administrada con el objeto de tratar de evitar la no participación del habitante o que exista sesgo de las respuestas. El formulario no tiene identificación, la persona elige de forma aleatoria un sobre en blanco, llena la encuesta, cierra el sobre y lo coloca en urna cerrada. Esta es abierta al final de la jornada, por lo cual se garantiza la no relación de los individuos con las respuestas.

A.2.- ANALIZAR EL ESTADO DE SALUD Y MORBILIDAD DE LA POBLACIÓN DE RAWSON.

Se desarrolla por el personal del equipo de salud de la localidad de Rawson, reforzado por profesionales especialistas del Hospital de Chacabuco y que forma parte de las actividades, normas y programas que son desarrollados en el Partico de Chacabuco.

En el Hospital de Rawson se efectuó el relevamiento de la población mediante historia clínica dirigida a la detección actual de enfermedades con o sin tratamiento como así también posibles factores de riesgo de enfermedades prevalentes.

La historia clínica estructurada cuenta de anamnesis, examen físico, exámenes de laboratorio, radiografía frontal de tórax y electrocardiograma en reposo de 12 derivaciones.

La tarea de registro y carga de la historia clínica de cada habitante se efectúa por médicos del Hospital Municipal de Rawson.

A.3.- EVALUAR BARRERAS Y FACILITADORES PARA EL ACCESO AL SISTEMA DE SALUD DE LOS HABITANTES DE RAWSON.

Se registra en las diferentes visitas que se desarrollan en la localidad las posibles barreras y elementos facilitadores en el acceso a la atención de salud. Los mismos se diferenciarán en institucionales / organizacionales, estructurales / edilicios y poblacionales, identificando en qué etapas del proceso de acceso a la atención sanitaria se presentan con más frecuencia. Esta tarea de diagnóstico y las sugerencias de mejora serán registradas para reconocer el impacto que se obtiene en el desarrollo del proyecto.

A.4.- LOGRAR UNA VISIÓN INTEGRAL DE LA SALUD EN LOS INTEGRANTES DEL EQUIPO DE SALUD.

Desarrollo de actividades conjuntas con los equipos profesionales, cursos de capacitación y seguimiento de las atenciones que se realizan a la población.

RESULTADOS

A.1.- CARACTERIZAR DETERMINANTES DE LA SALUD EN LO SOCIAL, LO CULTURAL, Y ECONÓMICO PARA COLABORAR EN EL DESARROLLO INTEGRAL DE LA COMUNIDAD DE RAWSON.

Fueron encuestados 725 habitantes, de los 2100 (55% de la población) >16 años de la localidad, con un promedio de edad de 45 años (16 – 83 años), 539 mujeres (74,40%) y 185 varones (25,60%) estando representados todos los grupos de edad. El número de personas encuestadas si bien representa sólo el 55% de la población mayor que figura como residente de la localidad según censo, sirve para presentar un perfil de la comunidad estable residente de Rawson.

En todos los lugares, las personas están expuestas a lo largo de su vida a una serie prácticamente ilimitada de riesgos para su salud, en forma de enfermedades transmisibles o no transmisibles, traumatismos, productos de consumo, actos violentos o catástrofes naturales. A veces son poblaciones enteras las que están en peligro; otras veces, sólo una persona[1].

El perfil de respuesta, como así la media de edad del estudio tiene una distribución similar a otro estudio efectuado en Polonia y los Estados Unidos de América en el 2004 en el cual se comparan las condiciones de salud, y se observa, que a medida que transcurre la edad la percepción de la buena calidad en la salud va disminuyendo[2].

Cuando se analiza la satisfacción de las personas por el sistema de salud, la categoría de satisfecho y muy satisfecho está en todos los grupos de manera mayoritaria, no registrándose respuestas de muy insatisfecho. Si se analiza la respuesta de algo insatisfecho, el peso negativo se incrementa a medida que aumenta la edad de los encuestados. **Gráfico 1**

En la consulta del estado de salud el 10% de las personas contestaron que el mismo era peor en la actualidad que el de 1 año atrás, el 65,89% no manifestaba cambios y el 22% consideró que su salud era mejor que hace un año.

En las respuestas obtenidas, al solicitársele a las personas que calificaran su salud, el 28,68% consideró que la misma era de muy buena a excelente, el 55,81% buena y el 13,95% regular. Al ser asociada esta percepción de su propia salud con la consulta de que, si por razones de la misma en los últimos días había tenido que interrumpir sus actividades, el 9,30% dijo que, si entre los que tenían una salud muy buena o excelente, y el 42,63% suspendieron sus actividades entre los que consideraron su salud como buena. **Gráfico 2**.

[1] WHO. Informe sobre la salud en el mundo 2002, http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_es.pdf)-

[2] Szaflarski, M; Cubbins, LA. Self-reported health in Poland and the United States: a comparative analysis of demographic, family and socioeconomic. Health: An Interdisciplinary Journal for the Social Study of Health, Illness and Medicine Vol 8(1): 5–31. 2004. DOI: 10.1177/1363459304038793

Grafico 1: Satisfacción expresada por el sistema de salud distribuido por grupo de edad. Rawson. 2017

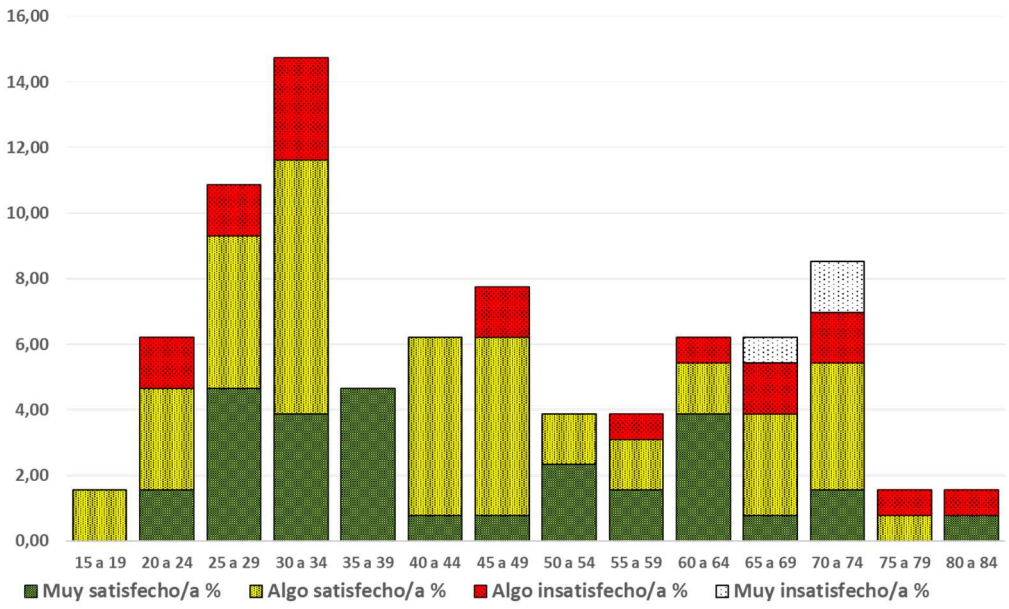
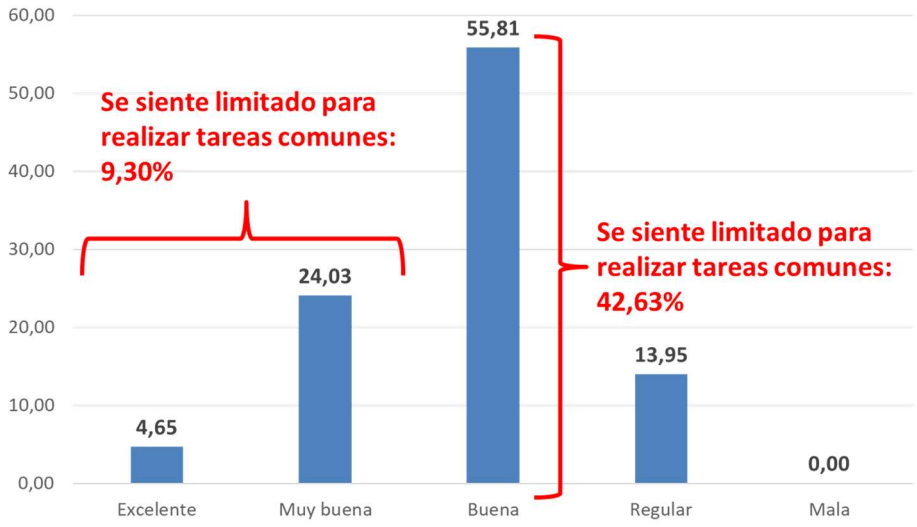


Gráfico 2. Calificación de su estado de salud y precepción de la persona para la realización de actividades comunes. Rawson. 2017



Profundizando en la respuesta anterior, se consultó sobre las causas que habían motivado la interrupción de sus actividades donde manifiesta razones físicas (22,64%), emocionales (21,93%), dolor (10,74%) y la asociación de ellas (46,51%). **Tabla 1**

Ningún riesgo existe de forma aislada. Muchos tienen su raíz en complejas cadenas de acontecimientos que abarcan largos periodos de tiempo. Cada uno de ellos tiene una causalidad única o múltiple. Por ejemplo, diferentes estudios muestran una relación directa entre el hábito de fumar, el consumo de alcohol, el sedentarismo, la ansiedad y los

malos hábitos alimenticios[3, 4, 5]. El sobrepeso y la obesidad son problemas que aumentan el riesgo de padecer diferentes enfermedades[6], los cuales se encuentran asociados principalmente a malos hábitos e inactividad física constituyéndose en factor de riesgo para padecer otras enfermedades crónicas.

Tabla 1. Razones por las cuales la persona considera por las cuales ha tenido que interrumpir sus actividades por problemas de salud. Rawson. 2017

Pregunta	% Respuesta
Durante las 4 últimas semanas, ¿ha tenido problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas a causa de su salud física?	22,64
Durante las 4 últimas semanas, ¿ha tenido problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido, o nervioso)?	21,93
Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?	10,74
Durante las 4 últimas semanas ¿con que frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a las amistades o familiares)?	46,51

Comparados nuestros resultados con aquellos presentados en la Encuesta Argentina de Alimentación Saludable[7] nuestros valores son superiores en IMC y a los a los presentados como promedio para los factores de riesgo[8].

Si se considera que en nuestro estudio el 50% de las personas manifiesta fumar y que el 62% está expuesta al humo de cigarrillo de manera habitual debe suponerse un exceso de riesgo en nuestra población ante los múltiples mecanismos patogénicos del tabaco, entre otros, la reducción de la monoamino oxidasa, enzima que se vincula con la función del estado de ánimo, lo cual puede llevar a efectos en la irregularidad del apetito o a las diferentes actitudes que se pueden adoptar hacia la comida. La nicotina aumenta el gasto energético y reduce y distorsiona el apetito, lo que explica por qué los fumadores tienden a consumir mayores cantidades de embutidos, condimentos, aderezos para ensaladas, bebidas gaseosas y muy pocas cantidades de verduras y frutas.

La inactividad física, acrecentada por otras costumbres nocivas de estilos de vida como mala alimentación conducente a sobrepeso u obesidad, el tabaquismo, estrés, mal uso del tiempo libre, consumo de sustancias psicoactivas son todos factores de riesgo o

[3] Szaflarski M. Gender, self-reported health, and health-related lifestyles in Poland. Health Care Women Int. 22(3): 207-27. 2001

[4] Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. Am J Clin Nutr. 87(4): 801-9. 2008

[5] Dean E. Physical therapy in the 21st century (Part I): Toward practice informed by epidemiology and the crisis of lifestyle conditions. Physiotherapy Theory and Practice 25(5-6): 330-353. 2009

[6] Makana Chock T. The influence of body mass index, sex and race on college students optimistic bias for lifestyle healthfulness. Nutrition Education and Behavior. 43(6): 1-8. 2011

[7] Alimentación Saludable, Sobrepeso y Obesidad en Argentina. http://www.msal.gob.ar/images/stories/ryc/graficos/0000001137cnt-2017 09_cuadernillo-obesidad.pdf

[8] Tercera Encuesta Nacional de de Factores de Riesgo para Enfermedades no Transmisibles. http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000544cnt-

enfermedades ya instaladas que deben ser vistos como blancos de acción de la medicina preventiva[9].

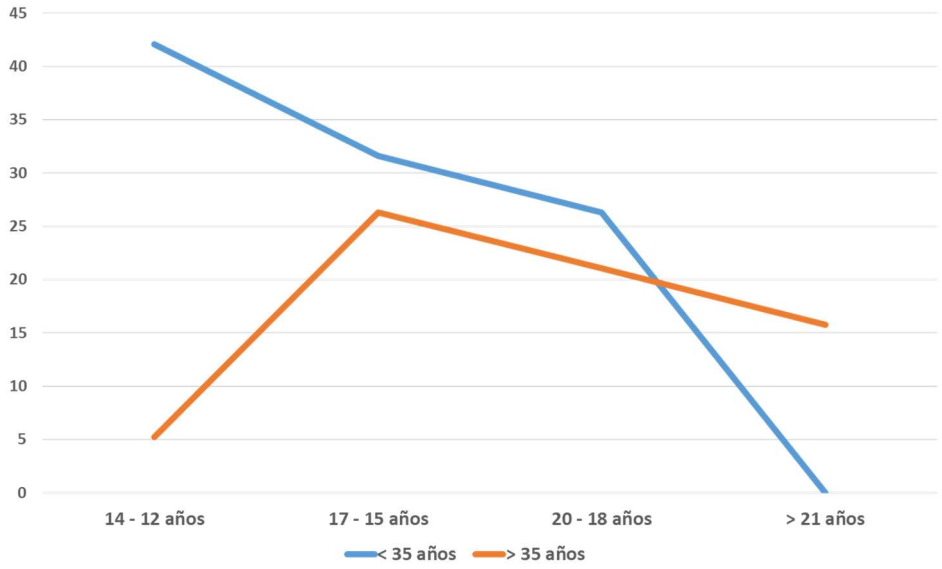
En el análisis de búsqueda de barreras individuales de acceso a la salud se consultó como se ha sentido y le ha ido en las últimas 4 semanas en base a su sensación de interrelación social. Tabla 2.

En búsqueda de habito y o adicciones el 38% de los encuestados fuma de manera rutinaria. Se observa que la población de jóvenes ha comenzado el consumo de tabaco a edades más tempranas (edad de corte 35 años); los menores de 35 años manifiestan haber comenzado a fumar entre los 12 – 14 años, mientras que los mayores lo hicieron a partir de los 15 – 17 años. **Gráfico 3**.

Tabla 2. Sensación individual en interrelación social. Rawson 2020.

Como se ha sentido y como le han ido las cosas durante las 4 últimas semanas.	Se sintió lleno/a de vitalidad?	Estuvo muy nervioso/a?	Se sintió con la moral tan baja que nada podía	Se sintió en calma y con gran tranquilidad	Tuvo mucha energía?	Se sintió con desánimo y tristeza?	Se sintió con agotamiento ?	Se sintió feliz?	Se sintió con cansancio?
	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Siempre	18,60	6,20	0,78	13,18	10,85	1,55	3,88	24,03	4,65
Casi siempre	24,03	4,65	3,88	13,95	14,73	4,65	4,65	21,71	9,30
Muchas veces	10,85	15,50	5,43	13,18	20,16	6,20	17,05	20,93	20,16
Algunas veces	24,81	34,11	20,93	34,11	31,01	33,33	37,98	19,38	41,09
Solo una vez	1,55	6,20	6,20	3,10	1,55	5,43	5,43	0,00	5,43
Nunca	6,20	19,38	50,39	8,53	8,53	35,66	16,28	1,55	9,30
No contesta	13,95	13,95	12,40	13,95	13,18	13,18	14,73	12,40	10,08

Gráfico 3. Edad en la que inicio a fumar. Rawson. 2017



[9] Vidarte Claros JA, Vélez Álvarez C, Sandoval Cuéllar C, Alfonso Mora ML. Actividad física: estrategia de promoción de la salud. Hacia la promoción de la salud. 16(1): 202-18. 2011

Analizando el riesgo de exposición al humo, “fumadores de segunda mano”, el 38% manifiesta no haber estado expuesto al humo en sus hogares, mientras que el 62% manifiesta estarlo de manera habitual.

Cuando se analiza el hábito de consumo de alcohol el 50% de la población lo realiza de manera rutinaria con diferentes frecuencias que van de manera diaria o 3 veces por semana en el 28% y de una vez por semana (preferentemente fines de semana) en el 38%. Al analizarse la edad de inicio de la actividad sexual, aquellos menores de 35 años lo hicieron antes de los 15 años de edad en comparación con aquellos mayores de 35 años que lo hizo sólo el 17%. La utilización de preservativos es más frecuente en los menores con el 62,96% con respecto a los mayores que los utilizan sólo el 37,04%. Los preservativos en el caso de los menores son fundamentalmente brindados por el sistema de salud (76,47%) mientras que en los mayores es por la compra privada.

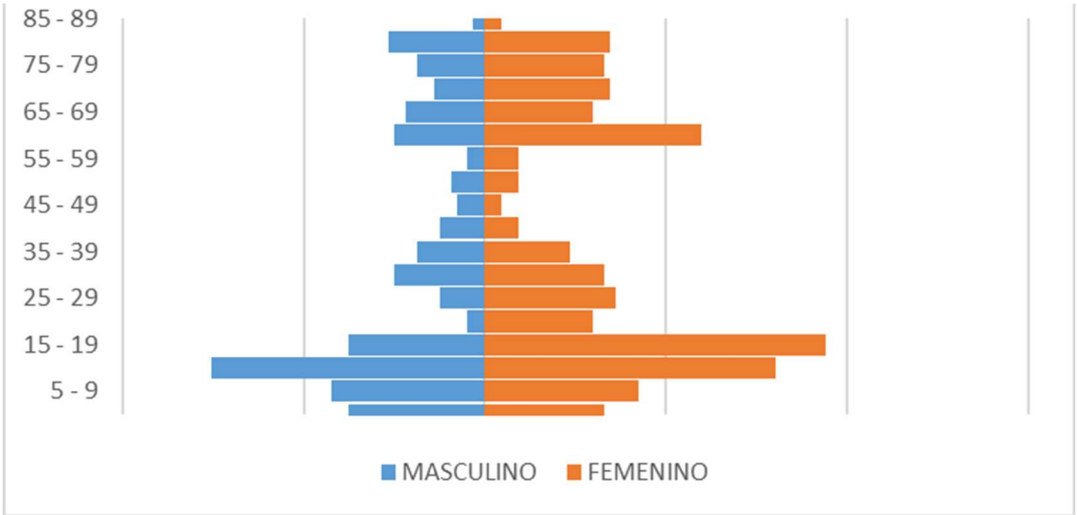
También se observa que el 23% de la población no ha mantenido relaciones sexuales en el último año, mientras que los menores de 35 años en el 9,21% las han tenido con 2 o más personas versus el 5,26% de los mayores.

A.2.- ANALIZAR EL ESTADO DE SALUD Y MORBILIDAD DE LA POBLACIÓN DE RAWSON.

La intención de este apartado es describir el perfil y la morbilidad de los habitantes de la localidad de Rawson con este objetivo se desarrolló HC como así una revisión de las fichas existentes en el sistema de salud para poder determinar las condiciones de salud.
En el período del estudio fueron analizadas 978 registros / HC con una media de 34 años rango de 0 a 89 años, 42,8% masculinos y 57,2% femenino.

En la pirámide de población se observa que los grupos que requieren atención en el hospital municipal son los de menor edad y los mayores, prácticamente no existiendo los grupos de edad intermedia, con una elevada reducción del sexo masculino. **Gráfico 4**.

Grafico 4. Pirámide de población de demanda al Hospital Municipal Rawson. 2020



PRODUCCION DE SISTEMA DE SALUD

En la producción de salud intervienen muchos factores y el conocimiento de estos factores y su importancia son de gran relevancia para el diseño de las políticas públicas, por lo cual es importante reconocer las necesidades de dar respuesta. En este objetivo se han medido las acciones en consultas, derivaciones y atenciones diversas que se efectúan anualmente en el hospital.

El Hospital Angel Rossi y Cz de Rossi cuenta con clínica médica y guardia de 24 hs.. Las especialidades que se ofrecen son traumatología, ginecología, kinesiología, O.R.L psicología, fonoaudiología, pediatría, nutrición y ecografía.

El Hospital desarrolló entre 700 a 1000 consultas mensuales (pediátricas y adultas). Las consultas por guardia representan el 52,17%. El 24% son prácticas asociada a kinesiología, 5% de las consultas son psicología (pediátrico y adulto) y el 6% odontológicas.

Consultas de adultos representan el 45%, de las cuales el 65% son segunda consulta o de control. De las primeras consultas el 19,3% corresponde a HTA, 14,66% patología biliar, 21,3% patología gastrointestinal, 10% infecciosa, 6,6% reumática, 6% dermatológica, 4% urológica. Las consultas gineco - obstetricas representaron el 2,5% de las consultas mensuales.

Kinesiología en promedio tuvo 191 consultas mensuales con actividades semanales.
En promedio se solicitan 83 muestras para estudios de laboratorio, 140 estudios radiológicos promedio y 15estudios ecográficos mensuales.

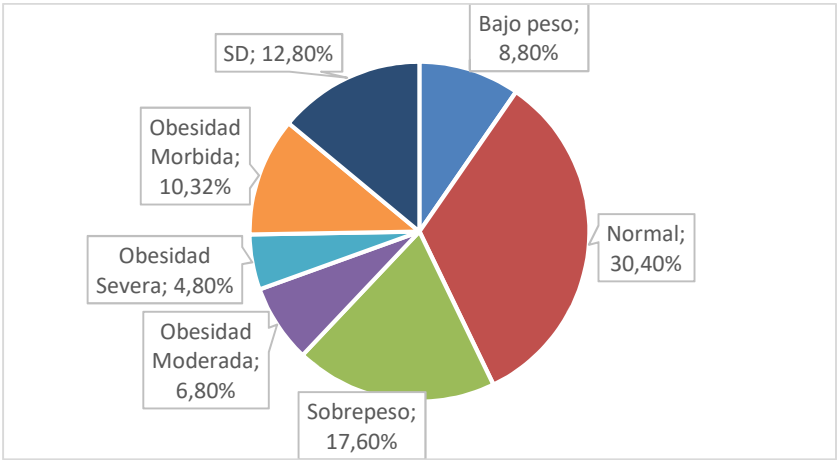
En el análisis de los registros para establecer los IMC[10] se obtiene que el 40,11% se encuentra entre sobrepeso y/o obeso **Tabla 3 y Gráfico 5.**

Tabla 3. Distribución por grupo de edad e IMC. Rawson. 2018

EDAD	BAJO PESO	NORMAL	SOBREPESO	OBESO
0 - 19 años	26.36	30.09	8.31	6.88
20 a 39 años	1.72	0.86	0.86	0.00
> 40 años	0.86	0.00	13.75	10.32

[10] Organización Mundial de la Salud (OMS), Obesidad y Sobrepeso, Nota descriptiva N°311 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/

Grafico 5. Distribución por IMC. Rawson. 2020



En el análisis de enfermedades cardiovasculares, el registro de la tensión arterial informa que el 100% de los mayores de 25 años tiene controles en el último año, cuando en el año anterior solo era el 68,80%.

En los registros se efectúa la evaluación de la condición de vacunados según el calendario de vacunación 2020 del Ministerio de Salud de la Nación[11], distribuidas por grupos de edad de 0 a 14 años. **Tabla 4**

En BCG se observa que en el 100% de los registros femenino figura el dato, al igual que en cuádruple, hepatitis B, polio y rotavirus, no siendo así en el masculino que muestran información variable. Llama la baja cobertura registrada para las vacunas antigripales, rotavirus y triple bacteriana.

En el grupo de edad de 5 a 9 años las coberturas son similares para ambos sexos.
En el grupo de 10 a 14 años las mujeres tienen una mejor cobertura a diferencia de los varones.

[11] https://vacunar.com.ar/wp-content/uploads/2021/12/CALENDARIO-VACUNACION-2022.pdf

Tabla 4 Vacunas registradas por sexo en los grupos de 0 a 14 años. Rawson 2020

VACUNAS		0 a 4		5 a 9		10 a 14	
		MAS	FEM	MAS	FEM	MAS	FEM
BCG	SD	12.50%	0.00%				
	Si	87.50%	100.00%				
	No	0.00%	0.00%				
Cuadruple	SD	12.50%	0.00%	0.00%	11.11%		
	Si	87.50%	100.00%	88.89%	77.78%		
	No	0.00%	0.00%	11.11%	11.11%		
Gripe	SD	75.00%	66.67%				
	Si	25.00%	33.33%				
	No	0.00%	0.00%				
Hep B	SD	12.50%	0.00%				
	Si	87.50%	100.00%				
	No	0.00%	0.00%				
Mening	SD	12.50%	16.67%			6.25%	0.00%
	Si	87.50%	83.33%			93.75%	100.00%
	No	0.00%	0.00%			0.00%	0.00%
Polio	SD	25.00%	0.00%	11.11%	11.11%		
	Si	75.00%	100.00%	88.89%	88.89%		
	No	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		
5 pentavalente	SD	25.00%	66.67%				
	Si	75.00%	33.33%				
	No	0.00%	0.00%				
Rotavirus	SD	62.50%	100.00%				
	Si	37.50%	0.00%				
	No	0.00%	0.00%				
Triple Bac	SD	62.50%	83.33%	33.33%	66.67%		
	Si	37.50%	16.67%	66.67%	33.33%		
	No	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		
Varicela	SD	50.00%	66.67%				
	Si	50.00%	33.33%				
	No	0.00%	0.00%				
HPV	SD					87.50%	100.00%
	Si					12.50%	0.00%
	No					0.00%	0.00%

Cuando se analiza las vacunas registras en los mayores de 15 años se obtiene que un muy bajo porcentaje ha sido vacunado para FHA, considerando que es un área de riesgo de la enfermedad. En el grupo de 20 a 50 años hay, según los registros muy baja población vacuna para todas las vacunas que se recomienda en el grupo, condición que se acentúa en aquellos mayores de 50 años. **Tabla 5**

Tabla 5. Vacunas registradas por sexo en los grupos de > 15 años. Rawson 2020

VACUNAS		15 a 19		20 a 49		> 50	
		MAS	FEM	MAS	FEM	MAS	FEM
Dob Bac	SD				88.24%	50.00%	53.85%
	Si				11.76%	50.00%	46.15%
	No				0.00%	0.00%	0.00%
Dob Viral	SD				58.82%	100.00%	100.00%
	Si				41.18%	0.00%	0.00%
	No				0.00%	0.00%	0.00%
FHA	SD	100.00%	95.00%		100.00%	100.00%	100.00%
	Si	0.00%	5.00%		0.00%	0.00%	0.00%
	No	0.00%	0.00%		0.00%	0.00%	0.00%
Gripe	SD				82.35%	100.00%	100.00%
	Si				17.65%	0.00%	0.00%
	No				0.00%	0.00%	0.00%
Hep B	SD				64.71%	100.00%	100.00%
	Si				35.29%	0.00%	0.00%
	No				0.00%	0.00%	0.00%
Neumo	SD					100.00%	100.00%
	Si					0.00%	0.00%
	No					0.00%	0.00%

A.3.- EVALUAR BARRERAS Y FACILITADORES PARA EL ACCESO AL SISTEMA DE SALUD DE LOS HABITANTES DE RAWSON.

¿Por qué algunas personas toman contacto con los servicios de salud y otras no? ¿Por qué algunos pacientes adhieren a tratamiento y otros no[12]. Los sistemas de salud tienen éxito cuando las personas se mantienen sanas o, en caso de enfermar, tienen acceso a los servicios sanitarios de acuerdo a su necesidad y están satisfechas con los servicios[13], el sistema sanitario es un determinante de la salud en sí mismo ya que interacciona y puede modificar el efecto de otros determinantes sociales que se definen como "aquellos factores y mecanismos por los cuales las condiciones sociales afectan el nivel de salud", que incluyen las características en que la gente vive y trabaja.

[12] Lalonde M. A New Perspective on the Health of Canadians: a working document. Canada, Minister of National Health and Welfare; 1981. Disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/hcs-sss/com/fed/lalonde-eng.php Acceso el 23 de enero de 2013

[13] Organización Mundial de la Salud. Subsanar las desigualdades en una generación: alcanzar la equidad sanitaria actuando sobre los determinantes sociales de la salud. Informe final de la Comisión sobre Determinantes Sociales de la Salud. Ginebra: OMS, Comisión sobre Determinantes Sociales de la Salud; 2008

Distintos modelos han sido utilizados para estudiar el acceso a la atención de salud, Donabedian[14] considera que el acceso es resultado de variables que van más allá de la disponibilidad de recursos y se centra en aspectos socio-organizacionales y geográficos. Este concepto es complementado por Anaderson[15] que identifica cuatro dimensiones: 1.- características contextuales (sistema de salud, familia y comunidad), 2.- características individuales, 3.- conductas de salud y 4.- resultados.

Según lo postulado por los modelos, el acceso sería el resultado del ajuste entre la oferta del sistema de salud y las necesidades de salud (demanda).

Considerado lo expuesto se puede decir que el acceso a la salud está condicionado en un equilibrio entre la oferta (Infraestructura sanitaria, recursos humanos, insumos, organización) y las necesidades de las personas (demanda) condicionada por la necesidad sentida/percepción, distancia, condición financiera, creencias culturales y religiosas entre otras.

En Rawson tiene 2.100 habitantes y la infraestructura de salud está representada por el Hospital de dependencia municipal (Partido de Chacabuco - Provincia de Buenos Aires). Este se referencia con el Hospital de Chacabuco cabecera del partido y distante a 53 Km por ruta nacional y provincial (asfaltada), y a 32 km por caminos vecinales de tierra a donde los vecinos de la localidad concurren para estudios de laboratorios y/o complementarios como así para sus internaciones.

El hospital es un establecimiento de salud con internación general, Categorización: Bajo riesgo con internación simple. Cuenta con 31 camas (generales: 29; pediátricas: 1 y obstétricas: 1), funcionando fundamentalmente como institución de contención de pacientes añosos y de salud mental. Como equipamiento cuenta con equipo de rayos (sin médico con técnico radiólogo), quirófano para partos y urgencias.

Desde una visión sanitaria hay barrera de acceso oportuno a estudios complementarios, no hay disponibilidad de laboratorio, y los mismos se hacen con el traslado de las personas a las localidades de Chacabuco o Chivilcoy. Como recursos humanos cuenta con: 9 profesionales, que funcionan por guardias de 24 hs. (que cubren las especialidades de pediatría, toco ginecología, ginecología y medicina general), psicología (1), odontología (1), kinesiología (1) y nutricionista (1). El área de enfermería cuenta con 8 profesionales y 10 auxiliares. El área administrativa cuenta con 5 personas y 7 de servicios generales.
El Sector privado está representado con 1 profesional que no vive en la localidad y se traslada de la Ciudad de Chacabuco y un enfermero que realiza las extracciones de sangre y las traslada a laboratorio de la localidad de Chivilcoy.

Cambios que se han registrado durante el desarrollo del proyecto:

ESTRUCTURALES / EDILICIOS

En el transcurso del proyecto de mejoran de las prestaciones en la localidad de Rawson y como resultado de inversiones efectuadas por la Municipalidad de Chacabuco en la comunidad que efectuó la ampliación de la red de agua potable y cloacas, se amplió el pavimento el 100%. Una vivienda utilizada para personas añosas fue mejorada, renacionalizada y adaptada. En el club local fue rehabilitada pileta de natación y se definieron senderos de salud entre otras intervenciones.

[14] Donabedian A. Aspects of Medical Care Administration. Cambridge: Harvard University Press; 1973
[15] Andersen RM, Davidson PL. Improving access to care in America: Individual and contextual factor. In: Andersen RM, Rice TH, Kominski GF, eds. Changing the American Health Care System: Key Issues in Health Services Policy and Management. 3.a ed. San Francisco, CA: Jossey-Bass; 2007. Pp. 3-31

En el hospital se trabajó en la re-funcionalización edilicia con pintura, mejora de techos y parquización del terreno circundante. Se construyó y equipo un área específica para el área de rehabilitación.

En el equipamiento se actualizó el equipo informático, red de internet y datos. Se digitalizó el equipo de rayos para diagnóstico remoto, se actualizó equipo de electrocardiografía y mamografía.

INSTITUCIONALES / ORGANIZACIONALES

Se organizó el sector de admisión con el objeto de disminuir el tiempo de espera de los pacientes con el armado de circuitos de circulación y orientación. Para el traslado de las personas en las derivaciones al hospital de Chacabuco el municipio financio vehículo. Para los estudios de laboratorio se organizó toma en el hospital y traslado.
Se organiza una escuela de enfermería en el hospital con traslado de docentes desde diferentes localidades.

A.4.- LOGRAR UNA VISIÓN INTEGRAL DE LA SALUD EN LOS INTEGRANTES DEL EQUIPO DE SALUD.

Esta etapa del Proyecto presento dificultades en su implementación por la ocurrencia de la pandemia COVID-19. Si bien se trabajó con los equipos de salud durante el año 2019, en el año 2020 se realizaron actividades virtuales dentro de las posibilidades de los equipos de salud.
Durante el último trimestre del año 2021 se efectuaron nuevas comunicaciones con el sistema de salud, el cual cambio la dirección y parte del equipo profesional con el cual se replanteo retomar acciones durante el 2022 con nuevas interacciones con el personal.

ABSTRACT

The aim of this work is to acknowledge a state of health in the population in the locality of Rawson, Chacabuco, Prov. Bs. As. and provide information for the implementation of community-based actions to improve population health.

Material and Methods.

In the first phase, anonymized surveys were conducted (Health Survey and Addictions Survey). The second phase is carried out through a structured population/clinical history review of health status at the local hospital.

Results.

10% of people say their health is worse than a year ago, 65.89% say it hasn't changed and 22% say it's better than it was a year ago; 28.68% rate their health as very good to excellent, 55.81% good, and 13.95% fair; common and regular activities were suspended in 9.30% of those who answered that their health is very good or excellent and 42.63% among those who considered their health to be good. 22.64% were for physical reasons, 21.83% for emotional reasons, 10.74% for pain and 45.51% for a combination of both. 50% of people smoke and 62% are regularly exposed to cigarette smoke.

Between 700 and 1000 monthly consultations were registered (pediatrics and adults): emergency 52.17%, kinesiology 24%, psychological (pediatrics and adult) 5%, and odontology 6%. 65% were a second visit or checkout. Among the first consultations, 19.3% correspond to an HTA, 14.66% to a biliary pathology, 21.3% to gastrointestinal

pathology, 10% to an infectious pathology, 6.6% to a rheumatic pathology, 6% of dermatology, 4% to a urologic pathology. According to the BMI, 40.11% are overweight and/or obese, in HTA 100% of those over 25 years are controlled.

Conclusion.

Community-based interventions are effective in influencing people's perceptions of their health if they are supported by adequate knowledge and acceptance of health and the health system.

Keywords: community health, health status

EL GÉNERO *BORRELIA* EN ESPECIES DE GARRAPATAS CON IMPORTANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA EN ARGENTINA

Gabriel L. Cicuttin

Instituto de Zoonosis Luis Pasteur

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas son consideradas enfermedades emergentes y reemergentes en numerosos lugares del mundo, incluso en nuestro país.

Las garrapatas del género *Amblyomma* presentan la mayor cantidad de especies de la región neotropical. En Argentina se determinó un total de 24 especies del género *Amblyomma*, en las regiones fitogeográficas del dominio Chaqueño, Amazónico y Andino-Patagónico. Diez especies fueron asociadas al ser humano, 13 sobre animales domésticos y otras sobre una gran variedad de animales silvestres.

Amblyomma tonelliae y *Amblyomma sculptum* (pertenecientes complejo *Amblyomma cajennense*) se distribuyen en el noroeste y noreste argentinos, parasitan a una amplia variedad de hospedadores, inclusive el ser humano. Son vectores de *Rickettsia rickettsii* en Argentina.

Amblyomma triste está asociada a humedades de la cuenca del Paraná hasta Bahía Samborombón, parasita una amplia variedad de hospedadores, inclusive a los humanos. Es vector de *Rickettsia parkeri* en Argentina.

Amblyomma tigrinum se distribuye en gran parte del país (región central), se encuentra relacionada filogenéticamente con *A. triste*, los adultos parasitan a carnívoros (siendo muy frecuentes en perros en regiones suburbanas-rurales del país) y también afectan a los humanos. Es vector de *R. parkeri* en Argentina.

Amblyomma aureolatum se distribuye de Misiones a CABA, los adultos son encontrados en carnívoros (frecuentemente perros) y también pican a los humanos. Es vector comprobado de *R. rickettsii* en Brasil. En CABA también ha sido detectada infectada con *Borrelia* sp.

Las borreliosis son causadas por bacterias en forma de espiroquetas gram-negativas del género *Borrelia* (familia Spirochaetaceae, orden Spirochaetales, filo Spirochaetes), que ha sido clasificado en dos grandes grupos: grupo Fiebre Recurrente (GFR) –transmitido por garrapatas blandas y duras, y piojo humano- y grupo Enfermedad de Lyme (GEL) –*Borrelia burgdorferi* sensu lato, transmitido por garrapatas duras-. Recientemente se ha agregado un nuevo grupo denominado REP (asociado en un principio a garrapatas de reptiles) relacionado al GFR.

Distintas especies de *Borrelia* del GFR han sido detectadas en garrapatas del género *Amblyomma* en todo el mundo, si bien los estudios son escasos. En EEUU, las garrapatas *Amblyomma americanum* se hallaron infectadas con *Borrelia lonestari* que ha sido asociada tentativamente a una enfermedad tipo-Lyme en ese país. También en EEUU, se notificó la presencia de una *Borrelia* sp. en la garrapata *Amblyomma maculatum*.

En cuanto a *B. burgdorferi* s.l. (GEL), en EEUU se han encontrado garrapatas *A. americanum* infectadas con esta bacteria. Sin embargo, el rol de *A. americanum* en la transmisión de la enfermedad de Lyme en ese país ha sido objeto de discusión por más de 30 años, y los estudios experimentales realizados presentan resultados contradictorios. Por último, en África y Asia se han detectado distintas especies de *Borrelia* del nuevo grupo REP. La mayoría de los hallazgos fueron en garrapatas de gran importancia veterinaria, sin embargo, actualmente la patogenicidad de estas bacterias es totalmente desconocida.

Situación en Argentina. La fiebre recurrente transmitida por piojos (GFR) es considerada endémica en Argentina, si bien las publicaciones son escasas. Respecto al GEL, ha sido detectada en diversas especies de garrapatas del género *Ixodes*. Un sólo estudio hay como antecedente en garrapatas del género *Amblyomma*: se detectó borrelias REP en garrapatas *Amblyomma aureolatum* (Cicuttin, en estudio, subsidio Fund. Roemmers 2016-2018).

OBJETIVOS

Estudiar la presencia, características moleculares y relación filogenética de *Borrelia* spp. en garrapatas con importancia para la salud pública (*Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tonelliae*, *Amblyomma triste*, *Amblyomma tigrinum* y *Amblyomma aureolatum*) en Argentina durante el período 2017-2018.

Objetivos específicos:

1) Detectar molecularmente la presencia de especies de *Borrelia* en las garrapatas.
2) Caracterizar molecularmente y analizar filogenéticamente los hallazgos de *Borrelia* spp.
3) Determinar la importancia en salud pública relacionando cada especie de Borrelia detectada junto con la ecología de la garrapata hospedadora.

METODOLOGÍA

Muestreo. Las garrapatas fueron colectadas de la vegetación en estudios previos realizados en todo el país. El muestreo fue realizado por dos métodos: bandera y trampas de dióxido de carbono, dado que algunas especies y/o estadios de garrapatas son más factibles de colectar según la metodología utilizada. Todas las muestras se conservaron en etanol al 70 % hasta su identificación taxonómica. Aproximadamente se utilizarán 100 garrapatas de cada especie.

Clasificación taxonómica de las garrapatas. Las garrapatas se identificaron bajo lupa estereoscópica siguiendo las claves taxonómicas y por comparación con material de referencia depositado en el INTA EEA Rafaela.

Extracción de ADN. Las garrapatas se procesaron en forma individual (adultos y ninfas) o en grupos de 10 ejemplares (larvas). A todas las muestras se les extrajo el ADN mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Alemania). Como control negativo de extracción se utilizó agua libre de nucleasas.

Reacción en cadena de la polimerasa. Para la detección de *Borrelia* spp. se utilizó una PCR anidada para un fragmento del gen *fla*. Como control positivo se utilizó *B. burgdorferi sensu stricto* y *Borrelia anserina* y como control negativo agua libre de nucleasas.

Análisis de los resultados. Los datos obtenidos fueron codificados e ingresados a una base de datos usando el software EpiInfo 7.1.2.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EEUU) para su correspondiente procesamiento, análisis e interpretación de los resultados.

RESULTADOS

Se procesaron 422 ejemplares de las especies *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. sculptum*, *A. tigrinum*, *A. tonelliae* y *A. triste*. En la Tabla 1 se presenta el detalle por especie, estadio, hospedador (o vegetación en el caso de aquellas colectas en su fase de vida libre) y localidad de colecta.

Todas las muestras analizadas resultaron negativas a la PCR anidada para el fragmento del gen *fla* del género *Borrelia*.

Tabla 1. Especie, localidad de procedencia, fuente de colecta (hospedadores/vegetación) y número de especímenes analizados de las garrapatas estudiadas.

Especie	Provincia	Localidad (Coordenadas geográficas)	Hospedador/vegetación	Estadio	n	Total
Amblyomma aureolatum	Entre Ríos	Colón (32°13′S, 58°08′O)	Perro	Adulto	4	**37**
		Feliciano (30°23′S, 58°45′O)	Perro	Adulto	2	
		La Paz (30°45′S, 59°39′O)	Perro	Adulto	8	
			Gato	Adulto	1	
		Paraná (31°43′S, 60°31′O)	Perro	Adulto	19	
			Gato	Adulto	2	
			Humano	Adulto	1	
Amblyomma brasiliense	Misiones	Parque Nacional Iguazú (25°41′S, 54°27′O)	Vegetación	Adulto	47	**92**
			Vegetación	Ninfa	35	
		Parque Provincial Puerto Península (25°43'S, 54°33'O)	Vegetación	Adulto	5	
			Vegetación	Ninfa	5	
Amblyomma ovale	Formosa	El Bagual (25°59′S, 58°24′O)	Vegetación	Ninfa	2	**8**
				Ninfa	4	

			Taraba major (Chororó)	Larva	2	
Amblyomma sculptum	Salta	Parque Nacional El Rey (24°15´S, 64°40´O)	Vegetación	Adulto	80	**80**
Amblyomma tigrinum	Córdoba	Nono (31°46′S, 64°59′O)	Perro	Adulto	4	**99**
			Vegetación	Adulto	11	
		Salsipuedes (31°09′S, 64°19′O)	Vegetación	Adulto	42	
	San Luis	Cortaderas (32°30′S, 65°00′O)	Gato	Adulto	19	
		Merlo (32°20′S, 65°00′O)	Perro	Adulto	23	
Amblyomma tonelliae	Salta	El Tunal (25°14´S, 64°25´O)	Vegetación	Adulto	52	**52**
Amblyomma triste	Buenos Aires	INTA E.E.A. Delta del Paraná (34°11´S, 58°50´O)	Vegetación	Adulto	35	**54**
		General Lavalle (36°22´S, 56°21´O)	Vegetación	Adulto	19	
Total						**422**

DISCUSIÓN

En el presente estudio no se detectó *Borrelia* spp. en diferentes especies de garrapatas de importancia para la salud pública pertenecientes al género *Amblyomma*. Cabe destacar que este es el primer estudio que evalúa la presencia de *Borrelia* spp. en garrapatas *A. sculptum*, *A. tigrinum* y *A. tonelliae*.

En Argentina sólo se habían estudiado previamente las especies *A. triste* y *A. aureolatum*, Cicuttin et al. analizaron 432 garrapatas *A. aureolatum* y 65 *A. triste* colectadas en la Reserva Ecológica Costanera Sur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, encontrando 1,7% de *A. aureolatum* positivas a una *Borrelia* sp. filogenéticamente relacionada al grupo REP. En dicho estudio, sólo ninfas de *A. aureolatum* resultaron positivas.

En América se halló *Borrelia* sp. REP en algunas especies del género *Amblyomma*: en Brasil se detectó en ninfas de *Amblyomma longirostre*, en Guayana Francesa se detectó en larvas de *A. longirostre* y *Amblyomma geayi*, en México se detectó en ninfas y adultos de *Amblyomma dissimile* y en EEUU se obtuvo a partir de adultos de *Amblyomma maculatum*. Las genoespecies de *Borrelia* del grupo REP halladas en EEUU, Brasil y Guayana Francesa están estrechamente relacionadas entre sí (posiblemente la misma especie) desde una perspectiva filogenética, pero no con la *Borrelia* sp. del grupo REP hallada en *A. aureolatum* de Argentina.

Stromdahl y col. realizaron una revisión sobre la asociación entre el GBB y el género *Amblyomma*, demostrando que los escasos hallazgos positivos (0,1% en casi 30.000 ejemplares estudiados) en *Amblyomma americanum* de EEUU corresponden a estudios en garrapatas colectadas sobre hospedadores (el ADN detectado está posiblemente relacionado a la ingesta de sangre infectada desde el hospedador) o a sospecha de contaminación en el laboratorio. Por otra parte, en otra revisión sobre estudios experimentales de competencia vectorial de *A. americanum* para *B. burgdorferi* s.l., se concluye que esta especie no contribuye o podría contribuir mínimamente al ciclo de transmisión de la borreliosis de Lyme.

Respecto al GFR, diversos estudios en *Amblyomma americanum* de EEUU reportan 1-3% de infección por *Borrelia lonestari*.

Considerando los escasos estudios realizados sobre la relación de garrapatas *Amblyomma* y *Borrelia* en Sudamérica, es necesario seguir investigando este tema, especialmente para el caso de especies de garrapatas que parasitan frecuentemente a aves, reptiles y anfibios, dado que estos hospedadores podrían actuar como potenciales reservorios y amplificadores en el ciclo enzoótico de las borrelias asociadas a *Amblyomma* en la región.

BIBLIOGRAFÍA

Barbour AG, Maupin GO, Teltow GJ, Carter CJ, Piesman J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. J Infect Dis. 1996; 173(2):403–409.

Binetruy F, Garnier S, Boulanger N, Talagrand-reboul É, Loire E, Faivre B, et al. A novel *Borrelia* species, intermediate between Lyme disease and relapsing fever groups, in neotropical passerine-associated ticks. Sci Rep. 2020; 10:10596.

Cicuttin GL, De Salvo MN, Venzal JM, Nava S. *Borrelia* spp. in ticks and birds from a protected urban area in Buenos Aires city, Argentina. Ticks Tick Borne Dis. 2019; 10(6):101282.

Colunga-Salas P, Sánchez-Montes S, Ochoa-Ochoa LM, Grostieta E, Becker I. Molecular detection of the reptile-associated *Borrelia* group in *Amblyomma dissimile*, Mexico. Medical and Veterinary Entomology. 2020; 52:1-5.

dos Santos CA, Suzin A, Vogliotti A, Nunes PH, Barbieri ARM, Labruna MB, et al. Molecular Detection of a *Borrelia* sp. in nymphs of *Amblyomma brasiliense* ticks (Acari: Ixodidae) from Iguaçu National Park, Brazil, genetically related to *Borrelia* from Ethiopia and Côte D'Ivoire. Ticks Tick Borne Dis. 2020; 11(6):101519.

Eisen L. Vector competence studies with hard ticks and Borrelia burgdorferi sensu lato spirochetes: A review. Ticks Tick Borne Dis. 2020; 11(3):101359.

James AM, Liveris D, Wormser GP, Schwartz I, Montecalvo M a, Johnson BJ. *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. J Infect Dis. 2001; 183 (12):1810–1814.

Lee JK, Smith WC, McIntosh C, Ferraric FG, Moore Hendersond B, Varela Stokes A. Detection of a *Borrelia* species in questing Gulf Coast ticks, *Amblyomma maculatum*. Ticks Tick Borne Dis. 2014; 5(4):449–452.

Margos G, Gofton A, Wibberg D, Dangel A, Marosevic D, Loh SM, et al. The genus *Borrelia* reloaded. PLoS One. 2018; 13(12):1–14.

Nava S, Venzal JM, González Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. London: Academic Press; 2017.

Pacheco A, Cordeiro MD, Cepeda MB, Luz HR, Cardozo SV, Berto BP, et al. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian J Vet Parasitol. 2019; 28(2).

Stromdahl EY, Nadolny RM, Hickling GJ, Hamer SA, Ogden NH, Casal C, et al. *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) ticks are not vectors of the Lyme Disease agent, *Borrelia burgdorferi* (Spirocheatales: Spirochaetaceae): A review of the evidence. J Med Entomol. 2018; 55(3):501-514.

ABSTRACT

No evidence of *Borrelia* spp. in *Amblyomma* ticks from Argentina.

The aim of the present study was to detect *Borrelia* spp. in different species of ticks of the genus *Amblyomma* from Argentina. A total of 422 tick specimens (*Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma tonelliae* and *Amblyomma triste*) from various provinces of Argentina (Entre Ríos, Misiones, Formosa, Salta, Córdoba, San Luis and Buenos Aires) were analyzed by nested PCR for a 306 bp fragment of the gene *fla* of the genus *Borrelia*. All samples were negative by PCR for a fragment of the gene *fla* of *Borrelia* spp. Considering the few previous antecedents in the region and that the tick species of the genus *Amblyomma* analyzed in the present study are important for public health, future studies on this genus of ticks are necessary.

ESTUDIO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO Y *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* PARA PACIENTES CON LESIONES ORALES Y ANOGENITALES, ASISTIDOS EN DOS HOSPITALES PUBLICOS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA

Cecilia Cuffini, Daniel David, Otilio Rosato, Cristina Marson, Ruth Ferreyra de Prato, Ramiro Tomasi, Pedro Pizarro

Laboratorio de Chlamydias y HPV en el Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", y el Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología, ambas instituciones de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Y el Hospital Rawson de la Ciudad de Córdoba

INTRODUCCIÓN

Los virus papiloma humanos (VPH), se encuentran extendidos en la naturaleza, se caracterizan por ser epiteliotrópicos, especie específicos y estar asociados a lesiones de diferente magnitud. Actualmente se han identificado más de 180 tipos de VPH, 40 de los cuales infectan la región anogenital. Estos últimos fueron clasificados como: VPH de bajo riesgo (preferentemente VPH-BR 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) comúnmente presentes en las lesiones benignas (condilomas y lesiones intraepiteliales de bajo grado) y VPH de alto riesgo (VPH-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) los cuales bajo la forma de infección persistente pueden conducir al cáncer, según lo informado en 1995, por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud[1]. Así mismo tres genotipos fueron clasificados como probables carcinógenos o de riesgo intermedio (VPH 26, 53,66) [2]. El VPH 16 es el más frecuentemente detectado en la mayoría de las neoplasias de cérvix a nivel mundial (aproximadamente 50% de los casos). Inclusive en Córdoba se detectó al VPH 16 como el más frecuente, seguido de los genotipos 18, 52 y 58 [3].

El cáncer de cabeza y cuello es un importante problema de salud en todo el mundo, la mayoría de estos tumores son carcinomas de células escamosas bucales (CCEB) y se caracterizan por una etiopatogenia multifactorial. La relación causal entre el consumo de tabaco y la ingesta de alcohol con el desarrollo de CCEB está bien establecida, mientras que el rol del VPH en el cáncer bucal es controversial [4-5]. En nuestra región, informamos que el VPH fue encontrado en el 88,9% de las lesiones bucales benignas, en el 41,4% de las lesiones potencialmente malignas (LPM) y en el 56,5% de las neoplasias. Los genotipos más prevalentes fueron el 16 y el 6 y los genotipos de alto riesgo fueron mayormente detectados en las lesiones de mayor gravedad[6]. En contraposición, el virus no fue detectado en personas que no presentaban lesiones de la mucosa oral. Así, se postula un posible rol del VPH en el proceso de malignidad de estas lesiones.

La inducción de carcinogénesis incluye la interacción de oncoproteínas (E6 y E7) de los tipos virales de alto riesgo con proteínas antioncogenes (pRb y p53) de la célula huésped. La persistencia es requisito para el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical,

existiendo muchos factores que pueden determinarla, por ejemplo: edad, anticonceptivos orales, multiparidad, hábito de fumar, infecciones de transmisión sexual (ITS); por ej.: *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*) [7-8]. Teniendo en cuenta la similitud morfológica entre el epitelio genital y oro faríngeo, y los hallazgos individuales de VPH y *C.trachomatis* en ellos [9], nos permite suponer que la evolución de la LPM podría verse condicionado, no sólo por los genotipos de VPH detectados sino también por la presencia de *C.trachomatis*. Nos proponemos como objetivo: Evaluar holisiticamente a aquellos pacientes con lesiones orales y anogenitales; compatibles con infecciones por Virus Papiloma Humano y Chlamydia trachomatis, asistidos en el Hospital Universitario Maternidad y Neonatología (HUMN) y en el Hospital Rawson (HR) y que no son incluidos en el Tamizaje realizado por el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, con el fin de estudiar los genotipos de VPH y su análisis filogenético para determinar las variantes circulantes, mutaciones asociadas a lesiones potencialmente malignas en mucosas bucal y anogenital y la presencia de *C.trachomatis* en estas lesiones a fin aportar datos sobre el posible rol sinérgico de esta coinfección.

Para lograr este objetivo se firmaron actas acuerdos de trabajo con los directores de cada centro de Salud. Se realizaron reuniones para unificar criterios en la selección e inclusión de los pacientes al proyecto. Al inicio de este trabajo se realizaron talleres con todo el personal de salud involucrado en el proyecto para recordar y reafirmar los criterios para obtener datos completos en las historias clínicas, las cuales se adaptaron ya que a los pacientes que asisten por lesiones anogenitales a consultorios ginecológicos o urología o ITS, NO se les consultaba sobre la existencia de lesiones en la mucosa de la cavidad aerodigestiva; y a la inversa, a los pacientes que asisten por lesiones de la mucosa oral a consultorios de odontología estomatológica, NO se les consultaba sobre la existencia de lesiones en las mucosas anogenitales. Asimismo en estos talleres se coordinó la obtención, identificación, conservación y traslado de las muestras.

Los pacientes que consultaron por lesiones orales, luego que el odontólogo estomatólogo realizaba una evaluación clínico estomatológica y reservaba muestras para el análisis citológico, anatomopatológico y de biología molecular; se le explicaba al paciente el riesgo de infección en otras mucosas y se lo invitaba a una consulta con el especialista médico para la evaluación de las mucosas anogenitales; luego que los pacientes voluntariamente firmaban consentimiento informado y aceptaban ser evaluados además por otro especialista.

Los pacientes que consultaron por lesiones anales o uretrales o cervicales, luego que el Profesional médico especialista realizaba una evaluación clínica y reservaba muestras para el análisis citológico, anatomopatológico y de biología molecular; le explicaba al paciente el riesgo de infección en la mucosa oral y se lo invitaba a una consulta con el especialista odontólogo estomatólogo para su evaluación.

Dentro de los 10 días de recibidas las muestras, los profesionales de la salud derivadores fueron informados por vía electrónica y por la carga de una planilla en tiempo real de Google Drive de los resultados de los patógenos estudiados en los pacientes para que contemplaran el tratamiento a seguir en cada uno de ellos y los controles que les realizarán.

Periódicamente se realizaron talleres con todo el personal de salud involucrado en el proyecto para recordar y reafirmar los criterios para obtener datos completos en las historias clínicas. En el taller del día 30/8/19 se coordinó el cierre de la recolección de muestras.

Se programó para marzo 2020 la realización del último taller con todo el personal de salud involucrado en el proyecto para obtener datos "completos" en las historias clínicas e informar los avances de resultados como devolución al equipo de salud que está frente a los pacientes. Esta actividad fue interrumpida por el ASPO debido a la cuarentena por la pandemia de COVID19.

Se incluyeron en este estudio 414 muestras (154 oral, 85 cervical, 31 vaginal, 128 anal, 16 pene) de 161 pacientes (57 varones y 104 mujeres) de los 3 centros que participaron (Hospital Rawson, Hospital Universitario Maternidad y Neonatología y las Cátedras A y B de Estomatología de la Facultad de Odontología de la UNC.

En 125 pacientes se obtuvieron al menos 2 muestras; una oral y la otra anogenital. Mientras que en 36 pacientes se obtuvo sólo una muestra; en 8 pacientes que consultaron por lesiones anales se estudió la lesión de la mucosa anal; y en 28 pacientes se obtuvo muestras de la cavidad oral ya que consultaron por lesiones estomatológicas. Y aunque se los invitó a participar para estudiar el resto de las mucosas, informándole el riesgo de que estas ITS estuvieran también allí, se negaron a la otra consulta y a la extracción.

A todas las muestras obtenidas le realizamos la extracción de ADN, utilizando el equipo comercial AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit de Bioneeer, con las condiciones que el fabricante describe en su protocolo. Y los extractos son conservados a -80ºC.

A los extractos de ADN de las muestras recibidas se le realizó la detección de VPH por PCR (con "primers" genéricos) y la posterior genotipificación por RFLP; optimizada en nuestro laboratorio [3]. Asimismo se realizó la detección de *C.trachomatis* según el protocolo optimizado en nuestro laboratorio [11].

Resultados generales finales obtenidos hasta la fecha 20/2/2020.

Considerando el total de las muestras estudiadas; se identificó una prevalencia de VPH: 16%, se identificaron los genotipos 6, 11, 16, 33, 40, 52, 53, 61 y 66. Siendo los más prevalentes VPH 6 (41%), VPH 11(25%), VPH 16(15%). La bacteria *C.trachomatis* se detectó en 114 muestras (28%).

La presencia de VPH se demostró en mucosa anal (23%), cervical (16%), oral (10%) y de pene (31%). Y *C.trachomatis* se detectó en mucosa cervical (41%), anal (27%), de pene (25%), oral (22%) y vaginal (29%). Este grupo de pacientes fueron estudiados de forma holística, ya sea porque consultaron por lesiones orales o anogenitales y se los invitó a una evaluación de las mucosas anogenitales y orales, respectivamente.

En total recibimos muestras de las mucosas orales y anogenitales de 161 pacientes.

Desde el **Hospital Universitario Maternidad y Neonatología** (HUMN); pudieron ser estudiadas 34 mujeres; de las mucosas orales [2 HPV + (5,9%); 11 C.tr + (32,6%)] y anogenitales [8 HPV + (23,5%); 15 C.tr + (44,1%)]. Los genotipos detectados en mucosa anogenital fueron: HPV 6, 11, 16, 52, 53 y 61.

Desde el **Hospital Rawson** (HR); pudieron ser estudiados 48 pacientes (29 varones y 19 mujeres). Fueron recibidas 35 muestras de mucosa oral [4 HPV + (11,4%); 6 C.tr + (17,1%)] y se recibieron muestras anogenitales de 44 pacientes [30 HPV + (68,1%); 11 C.tr + (25%)]. Los genotipos detectados en mucosa oral fueron: HPV 6, 16 y 40. Los genotipos detectados en mucosa anogenital fueron: HPV 6, 11, 16, 33, 61 y 66.

Desde la **Cátedra A de Estomatología de la Facultad de Odontología** de la U.N.C; 46 pacientes (16 varones y 30 mujeres). Fueron recibidas 46 muestras de mucosa oral [6 HPV + (13%); 9 C.tr + (19,6%)] y muestras anogenitales de 33 pacientes [4 HPV +

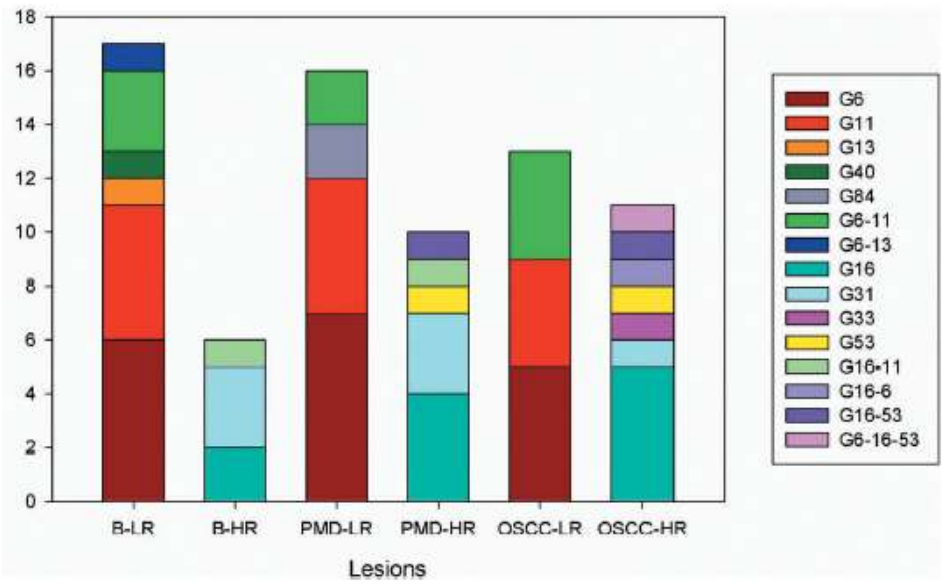
(12,1%); 14 C.tr + (42,4%)]. Los genotipos detectados en mucosa oral fueron: HPV 6 y 11. Los genotipos detectados en mucosa anogenital fueron: HPV 6, 16 y 33.

Desde la **Cátedra B de Estomatología de la Facultad de Odontología** de la U.N.C; 34 pacientes (14 varones y 20 mujeres). Fueron recibidas 34 muestras de mucosa oral [3 HPV + (8,8%); 8 C.tr + (23,5%)] y muestras anogenitales de 23 pacientes [3 HPV + (13%); 8 C.tr + (34,8%)]. Los genotipos detectados en mucosa oral fueron: HPV 6, 11 y 16. Los genotipos detectados en mucosa anogenital fueron: HPV 6 y 16.

Fue sumamente interesante que pacientes que consultaron por lesiones orales, se detectó ITS en la lesión oral y también en sus mucosas anogenitales y a la inversa también. Ellos recibieron tratamiento holístico de las infecciones.

El apoyo de la Fundación Roemmers nos ha permitido publicar los primeros resultados de este proyecto en revista internacional de alto impacto en el año: 2019, "Sexually transmitted infections in oral cavity lesions: Human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and Herpes simplex virus, Journal of Oral Microbiology, 11:1, 1632129, DOI: 10.1080/20002297.2019.1632129.

Describimos el hallazgo de ITS en lesiones orales de la mucosa de la cavidad oral. Estudiamos 318 pacientes (169 mujeres y 149 hombres) SOLO con lesiones orales; 137 de las muestras analizadas pertenecían a lesiones benignas (B), 96 a desórdenes potencialmente malignos (PMD) y 85 carcinomas orales de células escamosas (OSCC). Se obtuvo una prevalencia del 34,3% (109/318) de HPV positivos mostrando genotipos de bajo riesgo (LR) como el 6, 11, 13, 40 y 84; y genotipos de alto riesgo (HR) como el 16, 31, 33 y 53.



La prevalencia de *C. trachomatis* fue de 16,9% (54/318) y de Virus Herpes Simple (HSV) fue de 3% (10/318).

Table 3. Characteristics of HSV positive patients (n = 10).

HSV TYPE	SEX	LESION	HPV/GENOTYPE/RISK	*C. trachomatis*
1	F	B	-	+
1	F	B	-	+
1	F	B	-	-
1	F	B	-	-
1	F	B	-	+
*2	F	B	+/6–13/LR	+
2	F	B	-	-
2	F	B	-	-
1	F	PMD	-	+
1	M	OSCC	-	+

B: benign lesion, **PMD**: potentially malignant disorders; **OSCC**: oral squamous cell carcinoma.
HR: high risk; **LR**: low risk.
*Female patient with triple infection (HPV, *C. trachomatis* and HSV.)

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de HPV y *C. trachomatis* por sexo, edad y tipo de lesión (p> 0.05), aunque la presencia de HSV estuvo asociada de manera significativa a ambas variables (p = 0,02)

Table 4. STI co-infections in oral samples from 318 Argentinean patients.

		Total		Co infection HPV-*C. trachomatis*		Co infection HPV-HSV		Co infection (*C. trachomatis*-HSV)	
		N = 318 (100%)		*N* = 13 (4%)		*N* = 1 (0.3%)		*N* = 6 (1.8%)	
		n	(%)	*n*	(%)	*n*	(%)	*n*	(%)
Sex	**Male**	149	46.9	6	46.2	0	0	1	16.7
	Female	169	53.1	7	53.8	1	100	5	83.3
Lesion	**B**	137	43.1	6	46.1	1	100	4	66.6
	PMD	96	30.2	4	30.8	0	0	1	16.7
	OSCC	85	26.7	3	23.1	0	0	1	16.7
HPV genotype risk	**HR**			2	15.4	0	0		
	LR			9	69.2	1	100		
	W/G			2	15.4	0	0		

B: benign lesion, **PMD**: potentially malignant disorders; **OSCC**: oral squamous cell carcinoma.
HR: high risk; **LR**: low risk; **W/G**: without genotype detected.

En cuanto a la relación con el consumo de tabaco y alcohol, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre estos factores de riesgo y los agentes patógenos estudiados. Se debe destacar también que no fue posible obtener los datos acerca de la ingesta de alcohol y el consumo de tabaco de todos los pacientes estudiados en este trabajo, ya que solo fue posible obtener esa información de 85 de ellos. En relación a la ingesta de alcohol, 34 pacientes respondieron de manera afirmativa ante la consulta de si consumían alcohol y 51 indicaron que no.

La co- infección más frecuentemente detectada fue HPV-*C. trachomatis* (4%), seguida de *C. trachomatis*-HSV (1,8%) y en la mayoría de las co- infecciones el genotipo de HPV detectado fue BR. Una única paciente presentó triple infección en una lesión B con genotipos de HPV de BR y HSV tipo 2.

Se observaron mutaciones en los genomas de E6 y LCR del HPV16 detectados en lesiones orales; las cuales están asociadas a la evolución de la lesión a la oncogénesis y con estos resultados se está preparando el manuscrito para enviar a publicar.

Asimismo, el apoyo de la Fundación Roemmers nos ha permitido publicar los segundos resultados de este proyecto de investigación en revista internacional de alto impacto en el año 2020: "Oral Human Papillomavirus: a multisite infection" Med Oral Patol Oral Cir Bucal. May 1;25 (3):e425-30.

El virus del papiloma humano (VPH) tiene diferentes estrategias para persistir en las células. Esta característica nos ha llevado a considerar la presencia del virus en tejidos de la cavidad oral que no presentaban signos clínicos de infección.

Table 1: Prevalence of oral HPV infection in healthy individuals.

Year	Country	Sample	Sample size n	Age	Prevalence n (%)	Genotypes	Author
1994-96	Grace	cytobrush	169	14-85	19 (9.5)	6/16/11	Lambropoulos *et al.*
2000-02	Miyako Island, Japan	cytobrush	668	3-85	4(0.6)	16/53/71/12	Kurose *et al.*
2006	SJR Preto, Brazil	cytobrush	50	16-52	7(14)	18/18/52/61	Do Sacramento *et al.*
2000-06	Ohio, USA	oral rinse	542	25-87	22(4.06)	16/51/56/59/6/1	D Souza *et al.*
2007	Sardinia, Italy	saliva	164	4-77	30(18.3)	1/42/16/31	Montaldo *et al.*
2006-7	Brazil	cytobrush	100	20-31	0	NS	Esquenazi *et al.*
2009-10	Ohio, USA	oral rinse	5579	14-69	385(6.9)	16/62/55/84/72	Guillison *et al.*
2009-11	China	oral swabs	5351	25-65	36 (0.67)	16/45/58	Hang *et al.*
2012	Modena, Italy	cytobrush.	81	49-77	1(1.2)	16	Migaldi *et al.*
2013	Australia	oral rinse	307	18-35	7(2.3)	18/16/67/69/90	Antonsson *et al.*
2014-15	Treviso, Italy	oral rinse	500	19-35	20(4.0)	16/56/6/11/81/52/30/53/90	Lupato *et al.*
2014-15	Córdoba, Argentina	cytobrush	401	18-87	13(3.3)	11/84/6/81	Criscuolo *et al.*

MI Criscuolo, *et al.* Translational Research in Oral Oncology 3: (1–8) 2018.

El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de ADN-VPH en múltiples localizaciones de la cavidad oral. Se diseñó un estudio de casos y controles: Grupo de Carcinoma Escamoso Oral (OSCG), sanos n=72 y Grupo Control (GC), n=72, voluntarios sanos emparejados por sexo y edad con el OSCG. Se tomaron cuatro muestras del OSCG: saliva, biopsia, raspado de la lesión y del lado sano contralateral. En el GC se tomó una muestra de saliva y un raspado del borde posterior de la lengua. Se obtuvieron 432 muestras de 144 individuos. Se detectó ADN-VPH en 30 (42%) de los sujetos OSCG y en 3 (4%) de los GC. Se obtuvieron dos o más muestras positivas en el 67% de los OSCG, el 67% en saliva y el 60% en biopsia; en CG el 100% de los individuos fueron positivos en las dos muestras.

Table 2: General characteristics of the study groups.

Characteristics	TOTAL	OSCG	CG	OR	*P*
	n (%)	n (%)	n (%)		
Gender					
F	66(46)	33(46)	33(46)	------	------
M	78(54)	39(54)	39(54)		
Mean age	62	64,5	63	------	------
Tabaco					
Yes	61(42)	37(51)	24 33)	2(1,08-4,12)	p<0,03
No	83(58)	35(49)	48(67)		
Alcohol					
Yes	71(49)	35(49)	36(50)	0,92(0,48-1,76)	p<0,87
No	73(51)	37(51)	36(50)		
HPV					
Yes	33(23)	30(42)	3 (4)	16.43(5.10-52.94)	p<0.0001
No	111(7)	42(58)	69 (96)		
Total	**144**	**72**	**72**		

OSCG: Oral Squamous Cancer Group, CG: Control Group, OR: Odd Ratio

Table 3: Distribution of HPV in different sites.

GROUP	Saliva n (%)	Biopsy n (%)	C.lesion n (%)	C.healthy n (%)	TOTAL n (%)
OSCG					
One site	3(30)	2(20)	3(20)	2(20)	10 (15)
2 sites	6(33)	7(39)	3(17)	2(11)	18 (27)
3 sites	5(33)	3(20)	4(27)	3(20)	15 (22)
4 sites	6(25)	6(25)	6(25)	6(25)	24 (36)
CG					
One site	-	-	-	-	-
2 sites [a]	3(50)	-	-	3(50)	6 (100)

[a] In CG samples were taken only from saliva and posterior border of the tongue

Conclusiones: El VPH está frecuentemente presente en la cavidad oral como infección multifocal, incluso sin la presencia de lesiones clínicas, pero con una menor frecuencia estadísticamente significativa.

Con los subsidios recibidos entre ellos los de la Fundación Roemmers nos permitió publicar los siguientes resultados de este proyecto de investigación en revista internacional de alto impacto en el año 2021: "Human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in oral and genital mucosa of women with normal and abnormal cervical cytology" BMC Infectious Diseases, 21:422. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06118-3.

El VPH y *C.trachomatis* son las ITS virales y bacterianas más prevalentes en todo el mundo. Ambas suelen ser asintomáticas y pueden evolucionar hacia una infección persistente y pueden ser cofactores importantes para la transformación oncogénica. El objetivo fue evaluar la prevalencia de infección oral y genital por VPH y *C.trachomatis* en mujeres con citología cervical normal y anormal.

El estudio transversal incluyó 200 hisopados (100 orales y 100 cervicales) de 50 mujeres con citología cervical normal y 50 con citología cervical anormal. Las infecciones por VPH y *C.trachomatis* se detectaron mediante PCR con cebadores específicos.

Table 1 Characteristics of patients studied according normal and abnormal cytology status

		Normal cytology		Abnormal cytology		
	N	N	%	N	%	*p*-value
Total	100	50	100	50	100	
Age (years)						0.516
18–27	2	1	2.0	1	2.0	
28–37	42	25	50.0	17	34.0	
38–47	40	15	30.0	25	50.0	
48–57	12	7	14.0	5	10.0	
58–67	4	2	4.0	2	4.0	
Number of sexual partners						0.450
1 to 5	84	44	88.0	40	80.0	
6 to 10	11	5	10.0	6	12.0	
> 10	4	1	2.0	3	6.0	
Without data	1	0	0.0	1	2.0	
Oral sex						0.094
Yes	66	29	58.0	37	74.0	
No	34	21	42.0	13	26.0	
Anal sex						0.629
Yes	33	16	32.0	17	34.0	
No	67	34	68.0	33	66.0	
Pregnancies						0.597
0	19	12	24.0	7	14.0	
1 to 5	78	36	72.0	42	84.0	
6 to 10	3	2	4.0	1	2.0	
History of STIs						0.387
Yes	6	2	4.0	4	8.0	
No	94	48	96.0	46	92.0	
Oral lesion						0.753
Yes	2	1	2.0	1	2.0	
No	98	49	98.0	49	98.0	
Use of contraceptive method						0.234
Yes	69	31	62.0	38	76.0	
No	31	19	38.0	12	24.0	
Tobacco						0.283
Yes	20	7	14.0	13	26.0	
No	80	43	86.0	37	74.0	
C. trachomatis						**0.013**
Yes	49	19	38.0	30	60.0	
No	51	31	42.0	20	40.0	
HPV						**0.041**
Yes	27	18	36.0	9	18.0	
No	73	32	64.0	41	82.0	
Co-infection HPV- *C. trachomatis*						
Yes	14	7	14.0	7	14.0	1.000
No	86	43	86.0	43	86.0	

Se detectó ADN del VPH en el 27% (n = 27/100) de todas las mujeres independiente de su citología. De 100 muestras genitales se detectó ADN del VPH en el 18% (n = 18/100) y en el 14% (n = 14/100) de 100 muestras orales.

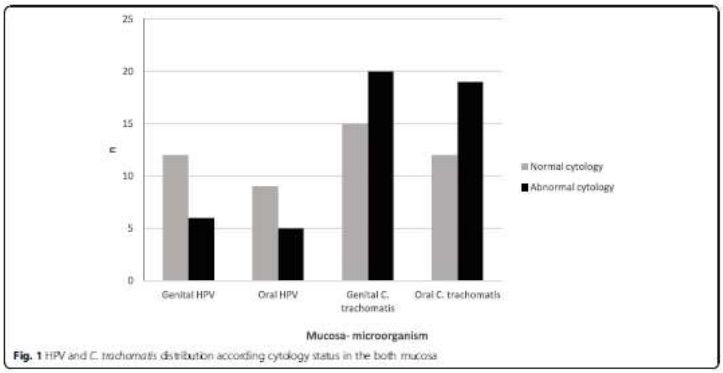


Fig. 1 HPV and *C. trachomatis* distribution according cytology status in the both mucosa

Los VPH detectados fueron el genotipo 6 de bajo riesgo y la coinfección 16, 31, 52, 58 y 16-31 de alto riesgo.

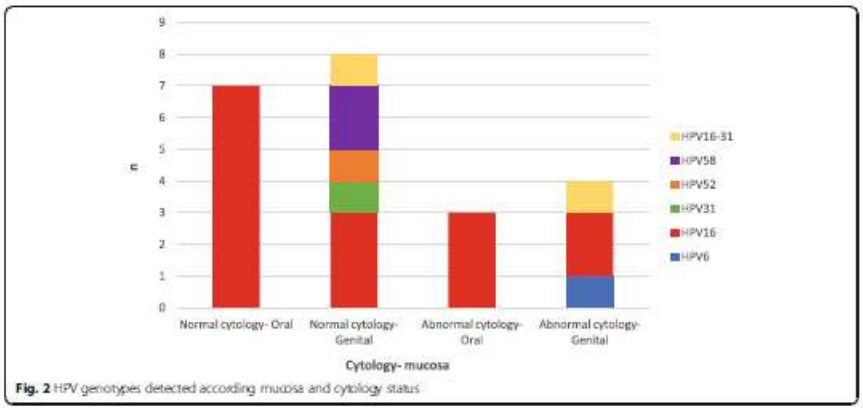


Fig. 2 HPV genotypes detected according mucosa and cytology status

Se detectó ADN de *C.trachomatis* en el 49% (n = 49/100) de las pacientes. De las 100 muestras genitales se detectó *C.trachomatis* en el 35% (n = 35/100) y en el 31% (n = 31) de las 100 muestras orales.

Table 2 Characteristics of 14 patients coinfected with HPV and *C. trachomatis*

Cytology	Genital HPV	Oral HPV	HPV type	Genital *C. trachomatis*	Oral *C. trachomatis*
Abnormal- LSIL		✓	16	✓	✓
Abnormal- HSIL	✓		16–31	✓	✓
Abnormal- LSIL		✓	W/G		✓
Abnormal- LSIL	✓		W/G	✓	✓
Abnormal- LSIL		✓	W/G		✓
Abnormal- LSIL	✓		W/G	✓	
Abnormal- HSIL	✓	✓	16		✓
Normal	✓		W/G	✓	✓
Normal	✓		16–31	✓	
Normal	✓		W/G	✓	
Normal	✓		58	✓	
Normal		✓	16	✓	✓
Normal	✓	✓	16	✓	
Normal	✓		W/G		✓

HSIL High-grade squamous intraepithelial lesion, *LSIL* Low-grade squamous intraepithelial lesion, *W/G* Without genotype

Existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la citología y la infección por VPH y *C.trachomatis*, pero no hay significación estadística entre la citología y las demás características.

Concluimos que dado que la histología de la mucosa oral se asemeja a la del cuello uterino, podemos anticipar la presencia de VPH y otras ITS que se detectan en diferentes lesiones de las zonas genitales y de la mucosa oral.

Por lo tanto, es importante la detección de *C.trachomatis* y el tratamiento específico en mujeres asintomáticas porque esta infección puede aumentar el riesgo de persistencia del VPH y la coinfección induce un entorno proinflamatorio que puede promover la carcinogénesis.

Se continúa analizando los datos de pacientes masculinos por centro, por motivo de consulta y asociación a factores de riesgo y localización de mono o coinfección, ya que por motivo del ASPO del año 2020, tuvimos la dificultad de acceder a completar los datos, además que los profesionales médicos que participaron del Hospital Rawson se jubilaron.

El apoyo de la Fundación Roemmers nos ha permitido comunicar y publicar los primeros resultados en eventos científicos nacionales, con excelentes comentarios y muy buena repercusión y en revista internacional de alto impacto.

Comunicaciones en poster; sobre los resultados parciales obtenidos de este estudio, en eventos científicos nacionales, con excelentes comentarios y muy buena repercusión.

1. Infecciones de transmisión sexual en lesiones de la cavidad oral: Virus Papiloma Humano, *C. trachomatis* y Virus Herpes Simple. Mosmann JP, y col. XIX Congreso SADI mayo 2019 Tucumán.
2. INFECCIÓN EXTRAGENITAL POR VIRUS PAPILOMA HUMANO EN MUJERES QUE CONSULTAN POR LESIONES CERVICALES. Mosmann Jessica y col. Congreso Argentino de Microbiología 25-27 set 2019 CABA.
3. DETECCION DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN MUCOSA ORAL Y GENITAL DE PACIENTES DE LA CIUDAD DE CORDOBA. Kiguen Ana Ximena y col. Congreso Argentino de Microbiología 25-27 set 2019 CABA.
4. Infección genital y extragenital por *C. trachomatis*: Estudio holístico de pacientes de Córdoba, Argentina. Kiguen Ana Ximena y col. XX Jornadas Investigación Científica Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. 9 de octubre de 2019.
5. 

Taller "Sácale la lengua al Cáncer" para comunicar los resultados, en los cuales se enfatizó sobre la prevención de estas infecciones de transmisión sexual a profesionales y población general, y participamos en las Jornadas Continuas de la Facultad de Odontología y en dos cursos talleres de actualización en ITS, declarados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología como de interés provincial. 2018, 2019, suspendidas en 2020 y 2021 y se programa para el 2022.

Publicaciones sobre los resultados parciales obtenidos de este estudio, en revistas científicas de alto impacto.

- Sexually transmitted infections in oral cavity lesions: Human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis* and Herpes simplex virus. Jessica P. Mosmann, Angel D. Talavera, María I. Criscuolo, Raúl F. Venezuela, Ana X. Kiguen, Rene Panico, Ruth Ferreyra De Prato, Silvia A. López De Blanc, Viviana Ré & Cecilia G. Cuffini. Journal of Oral Microbiology; Año: 2019 vol. 11 p. 1 – 7.
- Oral Human Papillomavirus: a multisite infection. María Inés Criscuolo, Rosana A Morelatto, Paola A Belardinelli, Jessica Mosmann, Cecilia Cuffini, Silvia A López de Blanc. https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1632129. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2020.*
- Association between Human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* genital infections in male partners of infertile couples. Olivera C, Cuffini et al. Scientific Reports 2021. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-99279-9.
- Human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in oral and genital mucosa of women with normal and abnormal cervical cytology. Mosmann J, Zayas S, Cuffini C

et al. BMC INFECTIOUS DISEASES 2021. http://dx.doi.org/10.1186/s12879-021-06118-3.

En este periodo uno de los integrantes de este proyecto alcanzo su título de doctorado:

- Codirectora de la Tesis de Doctorado en Odontologia del Od. Ramiro Tomasi, a partir de junio 2017. Tema "Estudio histopatológico, anatomopatologico y filogenético de líquenes orales y lesiones liquenoides orales en asociación al VPH". Proyecto aprobado. R.D. 2017/17. Defensa agosto 2020 Calificación: Sobresaliente.

Dificultades encontradas en la Investigación:

Es necesario realizar; periódicamente, reuniones talleres con los profesionales de los diferentes centros para afianzar los objetivos de este proyecto y fortalecer los mecanismos para la evaluación holística de los pacientes infectados por ITS.

La mayor dificultad que encontramos es que los pacientes atendidos en las cátedras de estomatología de la Facultad de Odontología asistan puntualmente al turno que se le había otorgado en los centros de salud, en los cuales serían evaluadas las mucosas anogenitales por los profesionales médicos. Por esa razón hay pacientes que se pudo obtener solo la muestra de la mucosa de la cavidad aerodigestiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. IARC. (2007). Monograph(89): 223- 273.
2. Muñoz N, et al. N Engl J Med. 2003; 348(6):518-27.
3. Venezuela RF, et al. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2012; 54; 11- 6.
4. Syrjanen, S. Eur J Oral Sci. 2018: 126 Suppl 1: 49-66.
5. Campisi G and Giovannelli L. Head Neck Oncol. 2009 Mar 30;1:8.
6. Venezuela RF, et al. J Microbiol Res. 2013: 3: 3- 5.
7. Criscuolo M, et al. Trans Res Oral Oncol. 2018; 3: 1- 8.
8. Simonetti AC, et al. Microbes Infect. 2009;11(4):435-42.
9. Knowlton AE, et al.PLoS One. 2013;8(1):e54022. .
10. Kiguen AX, et al. Case Reports Clin Med. 2014; 3(2): 97- 100.
11. Lan J et al. J Clin Microbiol. 1994; 32(2): 528–530.
12. Mosmann J, et al. J Oral Microbiol. 2019; 11: 1632129.
13. Criscuolo I, et al. Transl Res Oral Oncology. 2018; 3:1-8
14. Mosmann JP, et al. BMC Infect Dis. 2021; 5;21(1):422.

ABSTRACT

The similar morphology between the genital and oropharyngeal epithelium and previous findings of HPV and C. trachomatis in them suggests that the evolution of the lesions could be conditioned by HPV genotypes and also by C. trachomatis. Objective: To evaluate holistically those patients with oral and anogenital lesions, compatible with HPV and C.trachomatis infections, attended at the Hospital Universitario Maternidad y Neonatologia (HUMN) and Hospital Rawson (HR), in order to provide data on the synergistic role of this co-infection in oncogenesis.

HPV and *C.trachomatis* were detected in anal (23% and 27%), cervical (16% and 41%), oral (10% and 22%) and penile (31% and 25%) mucosa, respectively. All patients were studied holistically, received appropriate treatment, either because they consulted for oral or anogenital lesions.

HPV genotypes 6 and 16 were the most frequent at both sites.

It was most interesting that patients who consulted for oral lesions had STIs detected in the oral lesion and also in their anogenital mucosa and vice versa. They received holistic treatment. The medical and dental professionals involved in this project began to review the criteria for holistic patient management in reference to these STIs.

HPV is frequently present in the oral cavity as a multifocal infection, even without the presence of clinical lesions, but with a statistically significant lower frequency. Detection of C.trachomatis and specific treatment in asymptomatic patients is important because this infection may increase the risk of HPV persistence and co-infection induces a pro-inflammatory environment that may promote carcinogenesis.

The support of the Roemmers Foundation has allowed us to communicate and publish our results in national scientific events and in high impact international journals, with excellent comments and very good repercussion.

ESTUDIO DE MECANISMOS RESPONSABLES DE CAMBIOS FENOTÍPICOS DE FIBROBLASTOS SINOVIALES EN ARTROPATÍAS CRÓNICAS

María S. Di Genaro, Rodrigo Blas, Alicia Munarriz,
Rodolfo Pardo-Hidalgo, Héctor Tamashiro

Universidad Nacional de San Luis

INTRODUCCIÓN

Diferentes artropatías son causa importante de discapacidad para millones de adultos (1). Las artropatías más comunes son las artritis degenerativas como la osteoartritis (OA), y diferentes formas de artritis inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide (AR) y la espondiloartritis (SpA) (1-4). La OA es causada por alteraciones en el metabolismo y la señalización celular que conducen a la degradación del cartílago y de los tejidos circundantes (2). La AR es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica y la hiperplasia sinovial, y la destrucción ósea y del cartílago (4). La SpA afecta principalmente a adultos jóvenes y se caracteriza por inflamación de las articulaciones, destrucción del cartílago y hueso, y la formación de nuevo hueso (5). Aunque la OA, AR y SpA resultan en la destrucción del cartílago articular, sus etiopatogenias son diferentes y siguen sin haber sido totalmente dilucidadas. La investigación reciente se centró en células inmunes y citoquinas; por lo tanto, el papel de las células del estroma se ha abordado en forma limitada. En las articulaciones sanas, la membrana sinovial es una estructura delicada, donde residen sinoviocitos tipo fibroblasto (FS) que proporcionan proteínas nutritivas a la cavidad articular, secretan moléculas para la lubricación y controlan la remodelación fisiológica de la matriz extracelular por la secreción controlada de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y por la producción de varios componentes de la matriz extracelular como el colágeno (6). En la AR, los FS exhiben un fenotipo agresivo transformado, caracterizado por aumento de la proliferación, insensibilidad a la apoptosis, secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de MMPs, e invasión en hueso y en cartílago (7). Además, los miofibroblastos, células que juegan roles fisiológicos importantes en la cicatrización de heridas y patogénicos en la fribrogénesis, se han sugerido como nuevas células claves en la patogénesis de la SpA (8). Los mecanismos patológicos tempranos que explican el cambio a un fenotipo alterado en FS de estas artropatías crónicas inflamatorias siguen siendo en gran parte desconocidos.

La MMP-9 es una gelatinasa (conocida como gelatinasa B) capaz de escindir el colágeno desnaturalizado (gelatina), colágeno de tipo IV, y colágenos nativo tipo I y el II que existen principalmente en el cartílago (9). La MMP-9 se expresa en tres formas principales: monómero, homodímero y en un complejo con lipocalina asociada a la gelatina de neutrófilos (NGAL) (9). Además, MMP-9 se encuentra en baja concentración o está ausente en la mayoría de los tejidos normales. Sin embargo, la sobreproducción de

MMP-9 se ha observado en los LS de los pacientes con AR, y se ha encontrado correlación entre el aumento del nivel de actividad de MMP-9 y la gravedad de esta enfermedad (10). Además, en modelos animales, MMP-9 demostró jugar un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria de las articulaciones (11). Por otro lado, interleuquina (IL)-6 es una citoquina pleiotrópica expresada por una variedad de células inmunes y no inmunes (12). Los niveles circulantes de IL-6 son elevados en pacientes con varias enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo la AR (13). Por lo tanto, IL-6 se ha surgido como un blanco terapéutico importante para AR (14). La inducción secreción de MMP-9 es un mecanismo directo por el cual IL-6 puede contribuir a la artritis (12). Sin embargo, los mecanismos por los que IL-6 contribuye a la patogénesis de las artropatías crónicas no se conocen completamente. Entre las moléculas que actúan como patrones moleculares asociados al daño (por su sigla en inglés DAMPs), la proteína S100A8 ha sido reportada inducir IL-6 entre otras citoquinas pro-inflamatorias, y ha sido sugerida como marcador inflamatorio de artropatías crónicas como artritis psoriásica (15), por lo que proponemos analizar el rol de esta moléculas en la inducción de IL-6 y de MMP-9.

El propósito del presente trabajo fue realizar un estudio comparativo de los efectos de los líquidos sinoviales (LS) de pacientes con OA, AR o de SpA en FS, analizando la producción de IL-6, la actividad de MMP-9 de estas células, y la migración y proliferación celular. Además, proponemos analizar los diferentes componentes presentes en los LS y los mecanismos moleculares asociados con los cambios fenotípicos. El LS es un filtrado de plasma situada en la articulación, donde también se reciben aportes de proteínas de los tejidos circundantes: el cartílago articular, la membrana sinovial y el hueso (16). Por lo tanto, la composición de LS es muy compleja, influye fuertemente en el microambiente de las articulaciones incluyendo los FS, y representa un elemento inseparable de la enfermedad. Estudios previos han demostrado diferentes perfiles de proteínas y expresión de MMPs en LS de los pacientes con OA, AR o SpA (16,17). Nuestros estudios aportan datos sobre la influencia del microambiente sinovial en células con roles centrales en la patogenia de artropatías crónica. Los resultados contribuyen a dilucidar nuevos enfoques para limitar la activación persistente FS y para proponer blancos potenciales en futuras intervenciones terapéuticas dirigidos a cada artropatía inflamatoria en forma diferencial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los cambios fenotípicos diferenciales de fibroblastos sinoviales (FS), incluyendo producción de citoquinas, provocados por pooles de líquidos sinoviales (LS) de pacientes con osteoartritis (OA), artritis reumatoidea (AR) o espondiloartropatía (SpA).
2. Realizar un estudio cinético de la actividad de MMP-9 en los sobrenadantes de FS estimulados con los LS.
3. Estudiar en los LS, moléculas inductoras de los cambios fenotípicos diferenciales observados en los FS, en particular el rol de la proteína S100A8, una alarmina asociada a procesos inflamatorios.
4. Investigar los mecanismos efectores inducidos por los diferentes LS empleando inhibidores de las cascadas de MAPKs y de Jak1/Jak3, y agentes biológicos como anti-receptor de IL-6, anti-TNF o anti-IL-17.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes: se incluyeron pacientes con diagnóstico definido de OA según criterios diagnósticos del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (18), de AR según los criterios de clasificación de ACR/Liga Europea contra el Reumatismo (19) y de SpA según criterios de la Sociedad Internacional de medición de Espondiloartritis (ASAS, por sus siglas en inglés "Assessment of SpondyloArthritis International Society") (20,21). Se excluyeron los pacientes con tratamientos con agentes biológicos como anti-receptor de IL-6, anti-TNF o inhibidor de Jak-1/Jak3.

Muestras de pacientes: se obtuvieron los líquidos sinoviales (LS) de 9 pacientes con OA (3 hombres y 6 mujeres de edad promedio 73±10); de 10 pacientes con AR (1 hombre y 9 mujeres de edad promedio 54±13) y 9 pacientes con SpA (6 hombres y 3 mujeres de edad promedio 48 ± 19) que requirieron artrocentesis con fines diagnósticos o terapéuticos. Este procedimiento fue realizado por los médicos reumatólogos de San Luis o San Juan que participaron en el trabajo. Las SpA correspondieron a espondiloartropatías periféricas según clasificación ASAS (21): seis artritis psoriásicas, dos artritis reactiva y una artritis indiferenciada. Se solicitó Consentimiento Informado a los pacientes. El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) (Ref. CE 002/2017). Las muestras fueron recolectadas en tubos con EDTA. A fin de evitar cambios individuales extremos, se trabajó con un pool de 9-10 LS de cada una de las patologías. Las muestras fueron clarificadas por centrifugación y conservadas a -20ºC hasta su utilización como estímulo de los FS.

Obtención de FS: los FS fueron obtenidos desde los LS de acuerdo el método de Stebulis y col (22). Las células fueron cultivadas en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U penicilina y 100 □g/ml de estreptomicina a 37°C en atmósfera con 5% de anhídrido carbónico. Luego de sucesivos pasajes, las células fueron definidas por su característica morfológica bipolar y por la expresión de prolil-4 hidroxilasa (marcador de fibroblastos). Los experimentos fueron realizados entre los pasajes 4-6. También se empleó la línea inmortalizada de FS humanos SW982 obtenida de ATCC (American Tissue Celular Culture (Rockville, MD) y gentilmente cedida por la Dra. Victoria Delpino (UBA, Bs.As). Los FS de esta línea celular fueron cultivados en similares condiciones que los FS primarios. Las células fueron estimuladas con los diferentes pooles de LS en dilución 1/10.

Medición de la concentración de citoquinas: a diferentes tiempos luego del estímulo con los LS (24, 48 y 72h) se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo. En los mismos se determinó la concentración de las citoquinas IL-6, TNF, IL-23, IL-17 e TGF-□ empleando kits comerciales de ELISA (eBioscience, Biolegend o BD) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Zimografía: la actividad gelatinasa fue ensayada por el método de Hibbs y col (23) y fue visualizada por tinción con Azul de Coomasie al 0,5%. Las bandas no teñidas indican la presencia de actividad gelatinasa y su posición indica el peso molecular de la enzima monomérica, dimérica o complejada con NGAL. La intensidad de las bandas fue medida empleando el programa Image J 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Migración celular: se realizó en cultivos en confluencia mayor al 90% como describe Schreier T y col (24). Luego de 24h se midió el área de cicatrización (25).

Proliferación celular: fue evaluada por el método colorimétrico de MTT descripto por Mossman (26), y por el ensayo de dilución de CFSE por citometría de flujo (27).

Estudio de componentes inductores de los cambios en FS: se analizó la influencia de ácido hialurónico (considerado un DAMP) realizando los estímulos con LS previo tratamiento con hialuronidasa; y de proteínas, por tratamiento de los LS con proteinasa K (28). También, se realizó un estudio proteómico de los LS según el protocolo descripto en Mateos y col (16) y en colaboración con el Dr. Eduardo Callegari (SD Biomedical Research Infrastructure Network (SD BRIN) Sanford School of Medicine, University of South Dakota, Vermillion, SD, USA).

Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los cambios fenotípicos de los FS: se realizaron los estímulos en presencia de anti-receptor de IL-6, anti-TNF-□, inhibidor Jak1/Jak3, o de MAPKs (ERK, JNK o p38).

Estudio del rol de S100A8 en la inducción de IL-6: por western blot se analizó la presencia de S100A8 en los LS de los pacientes con artropatías como se describe en McCormick y col (29). Para estudiar el rol de S100A8 en la inducción de IL-6, se estimularon los FS con LS en ausencia y presencia de un anticuerpo neutralizante de S100A8 (Biolegend).

Análisis estadístico: todos los experimentos fueron realizados en forma independiente al menos 2 veces. Para las comparaciones, se empleó ANOVA de dos vías con prueba de Bonferroni o ANOVA de una vía seguida por prueba de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Objetivo 1. Comparar los cambios fenotípicos diferenciales de fibroblastos sinoviales (FS), incluyendo producción de citoquinas, provocados por pooles de líquidos sinoviales (LS) de pacientes con osteoartritis (OA), artritis reumatoidea (AR) o espondiloartropatía (SpA).

Morfología de FS: los FS mostraron morfología bipolar y resultaron positivos para prolil-4 hidroxilasa. Similares resultados fueron obtenidos en las células de la línea SW982 (Figura 1).

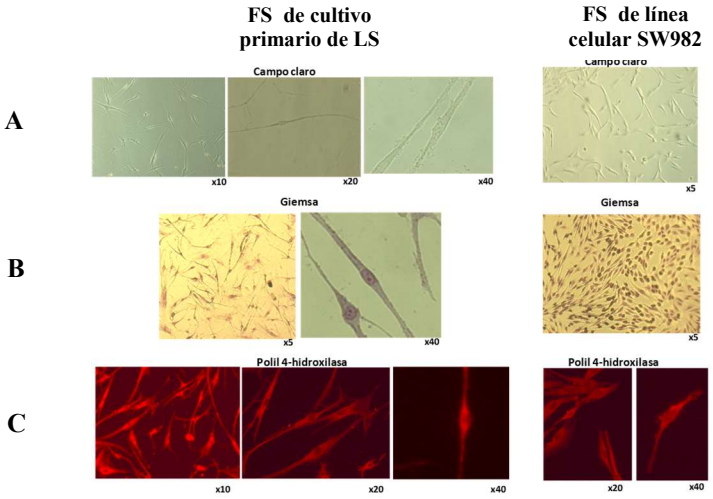


Figura 1. Fibroblastos sinoviales. Morfología de fibroblastos sinoviales (FS) de cultivo primario de líquido sinovial (LS) y de la línea SW982 observados en campo claro (A) y por coloración de Giemsa (B). Expresión intracitoplasmática de prolil 4-hidroxilasa (marcador de fibroblastos) en los FS observada por inmunofluorescencia (C).

Producción de citoquinas por FS estimulados con LS de pacientes con artropatías: se observó que TGF-β fue producido basalmente por los FS, su producción incrementó con el tiempo de cultivo y la estimulación con los LS no incrementó significativamente su secreción (Figura 2). Si bien TNF e IL-23 fueron inducidos en forma progresiva por los LS de todas las artropatías ensayadas, no se observaron diferencias entre los estímulos con LS de OA y las artropatías inflamatorias (AR y SpA) (Figura 2B y C). Se destacó la alta producción de TNF a 96 h por LS de AR (Figura 2B), y de IL-23 a 72 h por LS de SpA (Figura 2C). Los niveles de IL-6 mostraron diferencias marcadas entre las estimulaciones con el pool de AR o SpA versus OA o medio. Por lo que se decidió profundizar el estudio de las estimulaciones de FS en los microambientes sinoviales analizando la producción de IL-6. A tiempos tempranos (24 o 48h), FS primarios o células de la línea SW982 secretaron IL-6 solo frente al estímulo con LS de pacientes con AR o SpA (Figura 3).

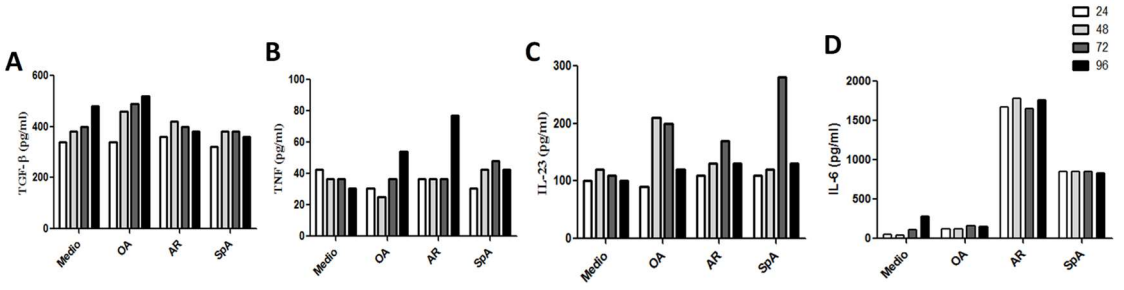


Figura 2. Niveles de citoquinas TGF-□ (A), TNF (B), IL-23 (C) e IL_6 (D) en sobrenadantes de FS primarios estimulados con pooles de líquidos sinoviales de OA (osteoartritis), AR (artritis de reumatoidea) o espondiloartritis periférica (SpA). Se muestran los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de estimulación (24, 48, 72 y 96h) de un experimento representativo de dos realizados.

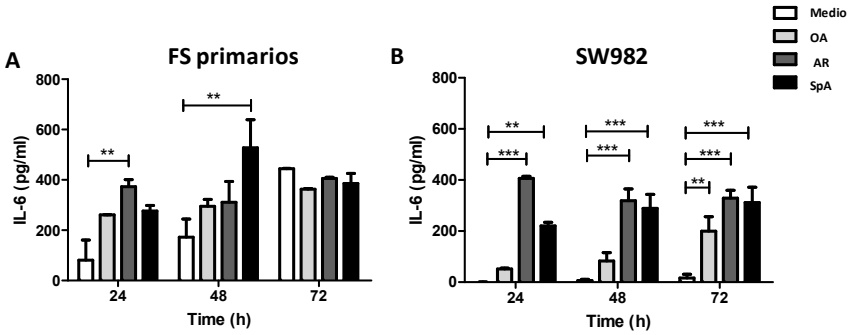


Figura 3. Niveles de IL-6 en sobrenadantes de FS primarios (A) o de la línea SW982 (B) estimulados con pooles de líquidos sinoviales de OA (osteoartritis), AR (artritis de reumatoidea) o espondiloartritis periférica (SpA). Se muestran los niveles de IL-6 en sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de estimulación (24, 48 y 72 h) obtenidos de dos experimentos independientes. **: p<0,001; ***: p<0,0001.

Efecto de LS de pacientes con artropatías sobre la migración de FS: en contraste a los LS de OA o AR, el pool de LS de SpA inhibió la migración de FS (Figura 4). Este resultado preliminar indicaría que el microambiente de SpA induce cambios fenotípicos diferenciales a aquellos provocados por OA y AR. Una reducida capacidad de migración y un incremento en su capacidad proliferativa son propiedades descriptas en miofibroblastos (30). Por lo tanto, investigamos marcadores de miofibroblastos en FS estimulados con LS de SpA. Demostramos que LS de SpA induce un incremento en la frecuencia de FS que expresan α-actina de músculo liso (α-SMA), un marcador de miofibroblastos. El inhibidor del receptor de IL-6 (Tocilizumab) inhibió escasamente la frecuencia de FS α-SMA^{+} (Figura 5). Por el método del MTT (Figura 6A) y por dilución de CFSE por citometría de flujo (Figura 4B), los pooles de LS de pacientes con OA, AR y de SpA indujeron proliferación de FS. Esta proliferación resultó significativamente superior cuando los FS fueron estimulados con LS de SpA (p<0,05). (Figura 6B). Tocilizumab inhibió escasamente la proliferación de FS estimulada por SpA (Figura 6C).

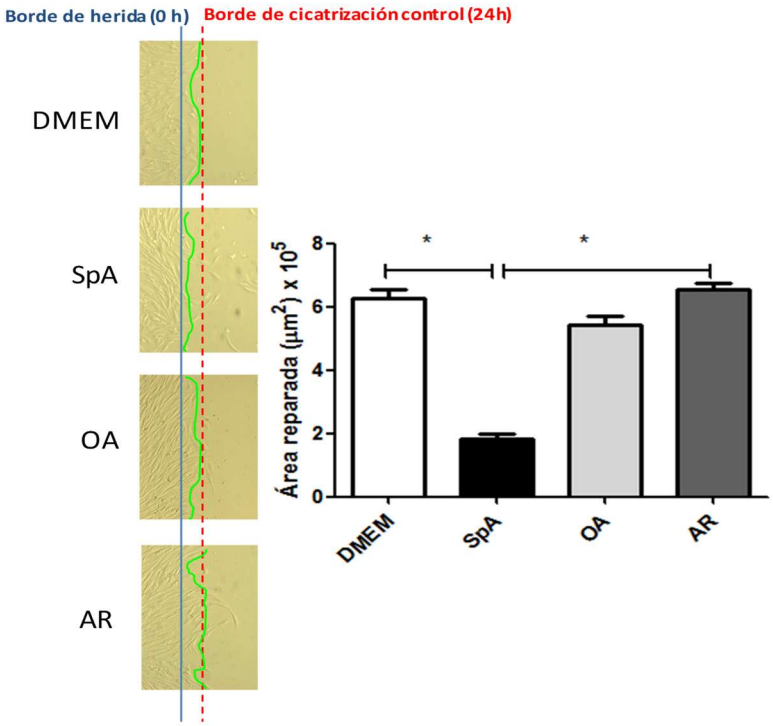


Figura 4. Migración celular de FS. Luego de realizar una herida en cultivos de FS SW982 en confluencia, se estimularon con un pool de SpA, OA o AR. Células incubadas con medio DMEM fueron empleadas como controles. Luego de 24h, se midió el área de cicatrización de la herida. *p<0,05.

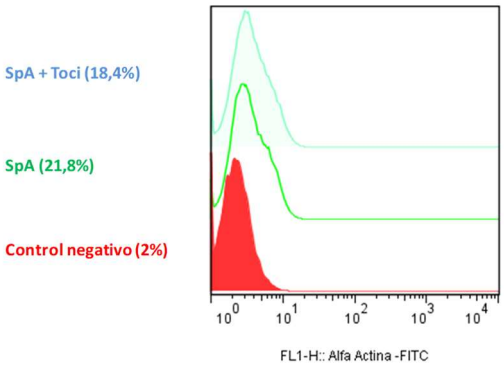


Figura 5. Estudio de Miofibroblastos. La frecuencia de FS que expresan □-actina de músculo liso (□-SMA), un marcador de miofibroblastos fue analizada por citometría de flujo en FS estimulados durante 72 h con un pool de SpA en ausencia o presencia del inhibidor del receptor de IL-6 (Tocilizumab). Entre paréntesis se muestra la frecuencia de FS □-SMA^{+} de un experimento de 2 realizados que mostraron resultados similares.

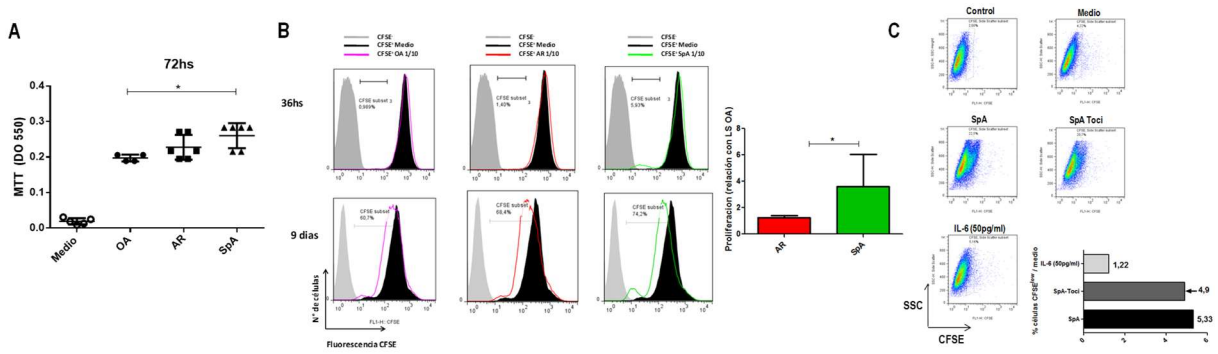


Figura 6. Proliferación de FS de la línea SW932 estimulados con pooles de LS de OA, AR o SpA. Analizados por el ensayo de MTT (A) y por dilución de CFSE por citometria de flujo (B).*p<0,05; vs células sin estímulo (Medio). C. Gráficos de puntos representativos de un ensayo de dilución de CFSE por citometría de flujo en FS estimulados con el pool de SpA en ausencia o presencia de Tocilizumab (200mg/ml), o con IL-6 (50pg/ml). * p<0,05.

Conclusiones del objetivo 1. A tiempos tempranos FS primarios y de la línea SW982 secretaron IL-6 solo frente al estímulo con LS de pacientes con AR o SpA, siendo la producción de esta citoquina diferencial en comparación con FS no estimulados o estimulados con LS de pacientes con OA. El LS de SpA induce cambios fenotípicos diferenciales en FS que reducen su migración celular pero incrementa la proliferación celular y la expresión de α-SMA, características descriptas en miofibroblastos.

Objetivo 2. Realizar un estudio cinético de la actividad de MMP-9 en los sobrenadantes de FS estimulados con los LS.

Se observó un diferente perfil de activación de MMP-9 y de sus precursores al comparar LS de OA con LS de AR o SpA (Figura 7A). En contraste a LS de pacientes con OA, los LS de pacientes con AR o SpA estimularon en FS la secreción creciente de MMP9 activa. Además, la banda de peso molecular correspondiente al complejo NGAL-MMP9, considerado una forma protegida de MMP9, se detectó con una intensidad mayor en FS estimulados con LS de AR o SpA (Figura 7B).

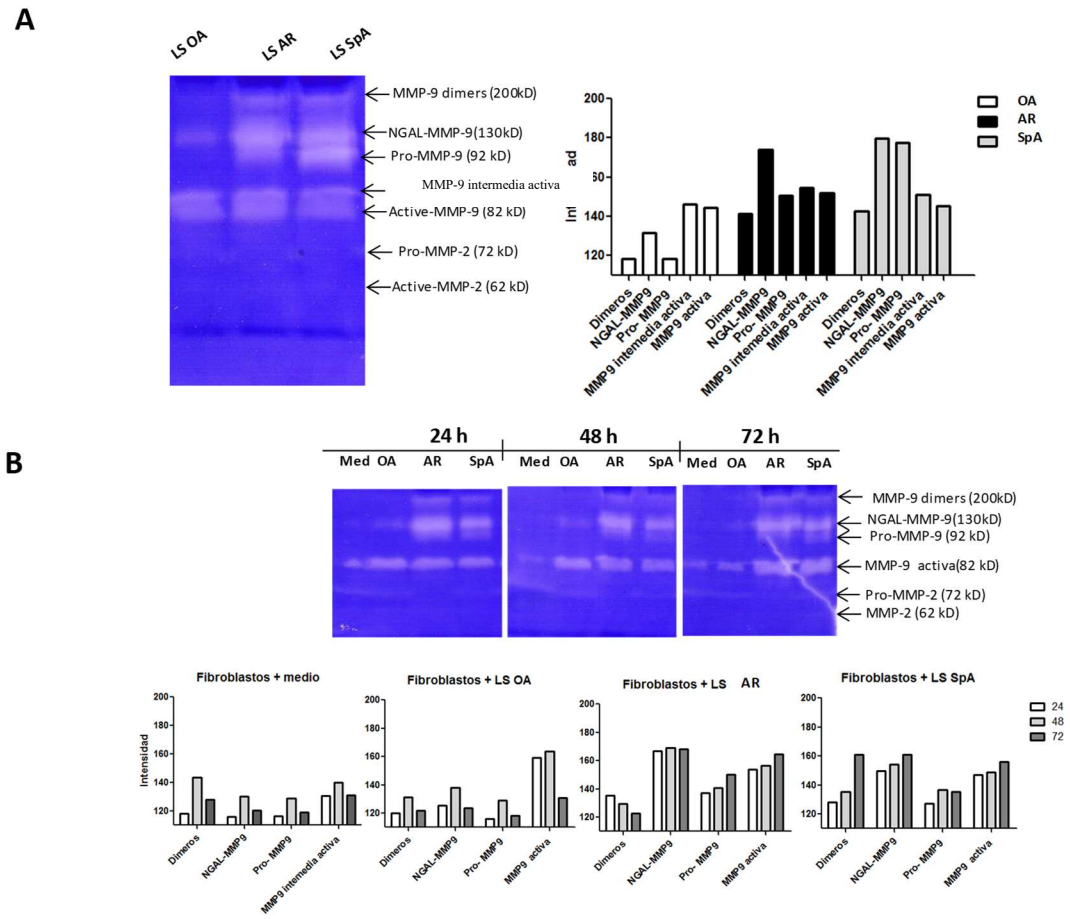


Figura 7. Actividad de MMP-9. Zimogramas de actividad MMP-9 en pooles de LS de OA, AR y SpA (A), y en sobrenadantes de fibroblastos estimulados con el pool de LS de OA, AR o SpA a diferentes tiempos (24, 48 y 72h) de estimulación (B). Las gráficas muestran el análisis de la intensidad de las bandas realizado empleando el software Image J. OA (osteoartritis), AR (artritis de reumatoidea) o espondiloartritis periférica (SpA)

Se observó que el inhibidor del receptor de IL-6 (Tocilizumab) inhibió significativamente la actividad MMP-9 en FS estimulados con los LS (Figura 8A). Detectamos correlación entre la disminución de la concentración de MMP-9 (Figura 8B) y de la actividad de MMP-9 (Figura 8C) en los sobrenadantes de cultivos de fibroblastos de la línea SW982 estimulados con LS de SpA en presencia de Tocilizumab).

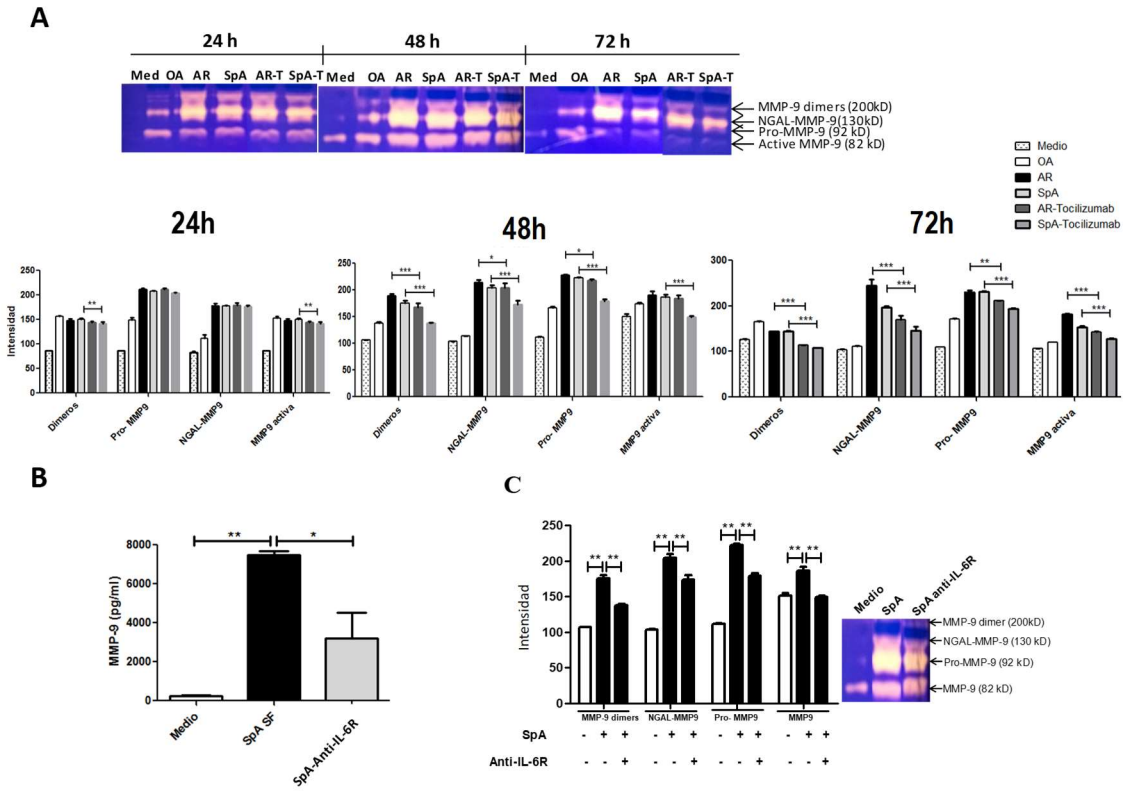


Figura 8. Efecto de la inhibición del receptor de IL-6 sobre la producción de MMP-9 por fibroblastos sinoviales. A. Zimogramas de actividad MMP-9 en sobrenadantes de fibroblastos estimulados con el pool de LS de OA, AR o SpA a diferentes tiempos (24, 48 y 72h) en ausencia y presencia del anticuerpo anti-receptor de IL-6 (Tocilizumab). Las gráficas muestran el análisis de la intensidad de las bandas realizado por Image J. Concentración de MMP-9 (B) y actividad de MMP-9 por zimografía (C) en sobrenadantes de cultivo estimulados 48 h con el pool de SpA en ausencia y presencia de anti-IL-6R (Tocilizumab). OA (osteoartritis), AR (artritis de reumatoidea) o espondiloartritis periférica (SpA). *: p<0,05; **: p<0,001; ***: p<0,0001.

Conclusiones objetivo 2. Los LS de pacientes con AR o SpA promueven en FS la secreción de IL-6 y la producción sostenida de MMP9 activa. IL-6 participa en la producción de MMP-9. Estos resultados sugieren que los LS de pacientes con AR o SpA recrean para FS un microambiente más patogénico que el mostrado por LS de pacientes con OA. El tratamiento con anti-receptor de IL-6 modularía el efecto inductor de actividad de MMP-9 de FS en el microambiente sinovial de espondiloartritis.

Objetivo 3. Estudiar en los LS, moléculas inductoras de los cambios fenotípicos diferenciales observados en los FS, en particular el rol de la proteína S100A8, una alarmina asociada a procesos inflamatorios.

Efecto de las proteínas del LS de SpA sobre la inducción de IL-6 en FS. A fin de analizar si componentes proteicos o el ácido hialurónico del LS de SpA participan en la inducción de IL-6 en FS, el pool de SpA fue ensayado previo tratamiento con proteinasa K (SpA-P) o con hialuronidasa (SpA-H). Se observó una reducción marcada en la secreción de IL-6 cuando el estímulo fue realizado con P-SpA (Figura 9).

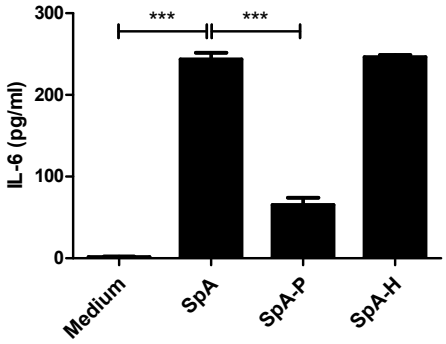


Figura 9. **Efecto de las proteínas del LS de SpA.** Degradación de proteínas del LS de SpA por tratamiento con proteinasa K reduce la inducción de IL-6 en FS. SpA-P: LS de SpA tratado con proteinasa K. SpA-H: LS de SpA tratado con hialuronidasa. *** p<0,001.

Análisis proteómico de pool de LS de SpA. Se identificaron 441 proteínas. Las clases de proteínas frecuentemente identificadas fueron: proteínas del complemento, apoproteina, serpinas, colágenos, histonas demetilasas, MMPs como MMP3, alarminas o DAMPs como S100A8/HNRNPM/HMG20B. Las proteínas más abundantes provenían del medio extracelular o del citoplasma (Figura 10).

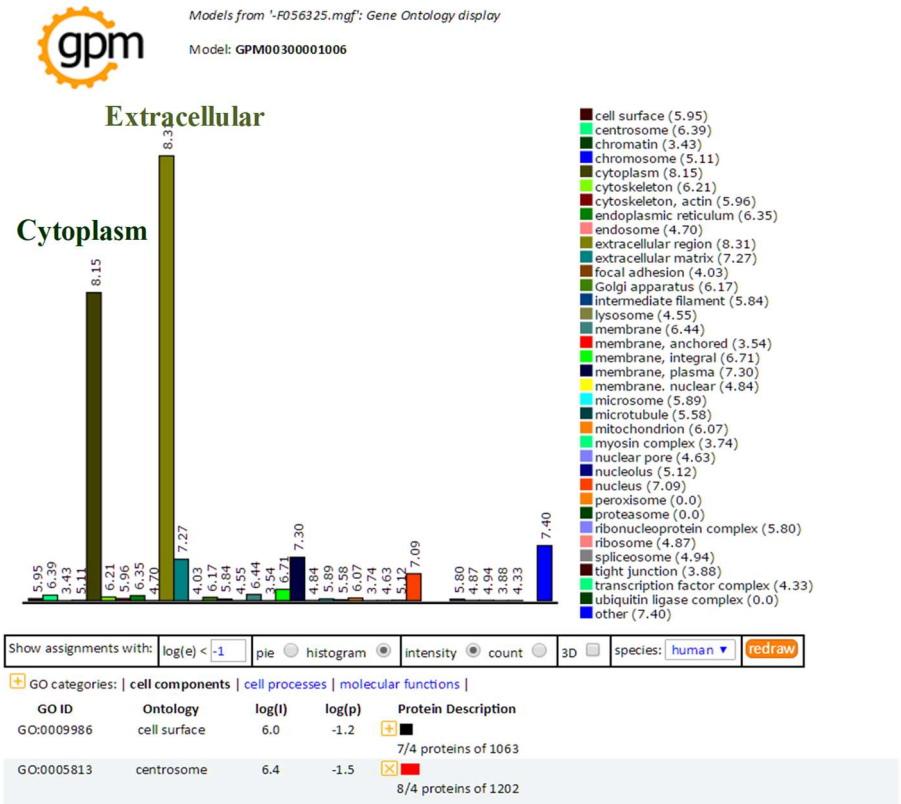


Figura 10. Análisis proteómico. Origen celular de los componentes presentes en un pool de LS de pacientes con SpA periférica.

Estudio de la presencia de S100A8 en LS de pacientes con SpA periférica. Se muestra en Figura 11 A, el perfil de proteínas del LS analizado por duplicado (calles 1 y 2). En la calle 3 de esta figura se muestra el perfil del LS en condiciones no reductoras (buffer de la muestra sin 2-mercaptoetanol). Se empleó S100A8 recombinante (1 µg) como

control. En la Figura 11B se muestra un Western blot del pool de LS de SpA periférica empleando el anticuerpo anti-S100A8 y revelado por quimioluminiscencia. Estos resultados indican la presencia de S100A8 en LS de pacientes con SpA periférica corroborando el estudio de proteómica realizado en colaboración con el Dr. Callegaria (Vermillion, SD, USA).

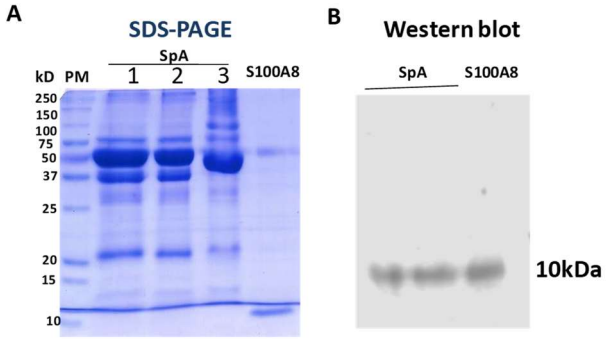


Figura 11. Estudio de la presencia de S100A8 en LS de pacientes con SpA periférica. En **A** se muestra el perfil de proteínas de un pool de 9 LS de pacientes con SpA periféricas analizado por duplicado (calles 1 y 2). En calle 3 se probó el LS en condiciones no reductora. Se empleó S100A8 recombinante (1 □g) como control (Biolegend 719902). En **B** se muestra Western blot del pool de LS de SpA periféricas empleando el anticuerpo anti-S100A8/9 (Biolegend 697503) y revelado por quimioluminiscencia.

Expresión de S100A8/A9 en FS: por inmunofluorescencia, se detectó una expresión basal intracelular de S100A8/S100A9 en FS de la línea SW982 (Figura 12). Este resultado indica que FS pueden ser una fuente productora de la S100A8/A9 detectada en LS.

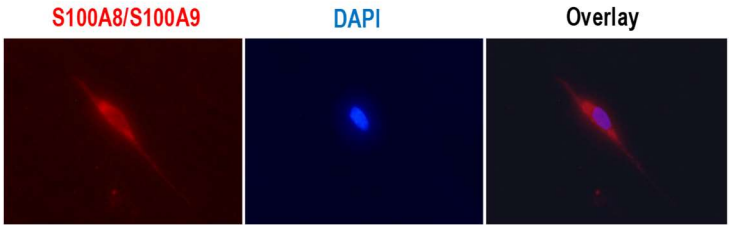


Figura 12. Expresión intracelular basal de S100A8/S100A9 en FS de la línea SW982 detectada por inmunofluorescencia. Se muestra tinción de los núcleos con DAPI y el solapamiento ("overlay") de ambas coloraciones que indica la expresión citoplasmática de S100A8/A9.

Efecto de S100A8 sobre la inducción de IL-6 en FS. Confirmamos que LS de SpA induce la producción de IL-6 por FS ($p < 0{,}001$ (Figura 13A), ya que la neutralización de S100A8/A9 redujo significativamente esta secreción ($p<0{,}05$ a 48h, $p<0.001$ a 96h). Además, S100A8 recombinante (10 ng/ml) indujo la producción de IL-6 ($p < 0{,}01$) (Figura 13B).

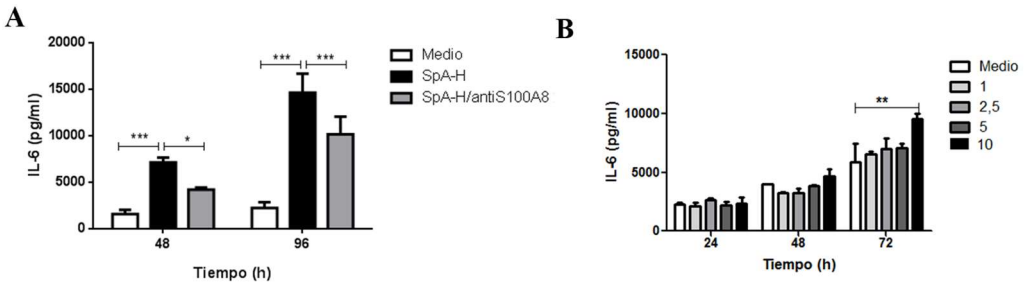


Figura 13. **Efecto de S100A8 del LS de SpA en la inducción de IL-6 en FS.** Los FS de la línea SW982 fueron estimulados con el pool de SpA tratado con hialuronidasa (SpA-H) en ausencia o presencia de anti-S100A8/A9 (20 mg/ml) en **A**, o con diferentes concentraciones de S100A8 (1-10 ng/ml) en **B**. Luego de 48 y 96 hs (A), o 24-72 hs (B), se midieron los niveles de IL-6 por ELISA. *p<0,05; ** p<0,01;*** p<0,001.

Efecto de la inhibición de S100A8/A9 sobre la producción de MMP-9 inducida por LS de SpA en FS. Se analizó la concentración de MMP-9 en el cultivo de células SW982 expuestas al microambiente sinovial de SpA en ausencia o presencia de anti-S100A8/A9. La neutralización de S100A8/9 disminuyó significativamente la concentración de MMP-9 en los sobrenandantes de cultivo (Figura 14). Este resultado indica que S100A8/A9 presente en el microambiente sinovial de SpA contribuye a la producción de MMP-9. Este efecto podría ser directo o mediado por la IL-6 inducida por S100A8/A9.

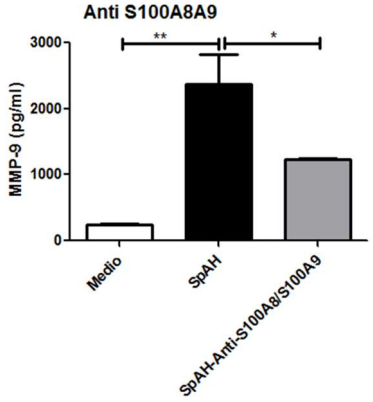


Figura 14. **Efecto de la neutralización de S100A8/A9 en la inducción de MMP-9 en FS por LS de SpA.** Cultivos de FS de la línea SW982 fueron estimulados con el pool de LS de SpA en ausencia o presencia del anticuerpo anti-S100A8/A9 (Biolegend, 20 g/ml). En los sobrenadantes de 48 hs, la concentración de MMP-9 fue determinada por ELISA. *p<0,05; ** p<0,01.

Efecto de S100A8 del LS de SpA en la inducción de cambios fenotípicos en FS. Se observó que el microambiente sinovial de SpA aumentó la frecuencia de FS α–SMA$^+$ luego de 72h, observándose reducción de dicha expresión en presencia de Tocilizumab o de anti-S100A8/A9 (Figura 15). La incubación con el inhibidor de Jak1/3 (Tofacitinib) no modificó la expresión de α–SMA en los FS (Figura 15). Similares cambios se detectaron escasamente en la intensidad de fluorescencia media (IFM).

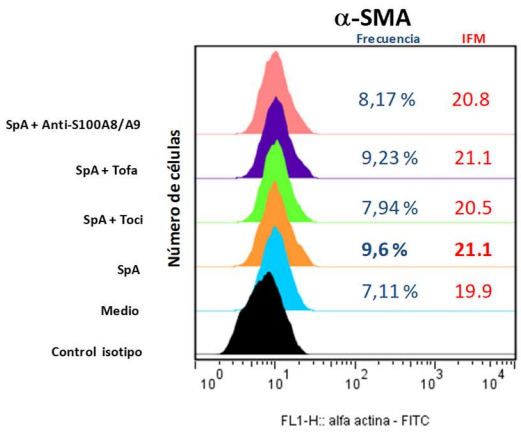


Figura 15. Expresión de □-SMA en FS estimulados con LS de SpA. Los FS fueron estimulados con un pool de LS de SpA (dilución 1/10). Después de 72 h, los FS se tiñeron intracelularmente para □-SMA y se analizaron por citometría de flujo. El microambiente sinovial de SpA aumentó la frecuencia de FS □-SMA^{+}. Toci: tocilizumab (receptor anti-IL-6). Tofa: Tofacitinib (inhibidor de Jak1/3). IFM: intensidad de fluorescencia media.

Conclusiones del tercer objetivo: Entre las diferentes moléculas identificadas en el pool de LS de pacientes con SpA periférica, se detectó S100A8, una molécula endógena que indujo la producción de IL-6 por FS. S100A8/A9 se expresa en el citoplasma de FS, indicando que estas células podrían secretar esta alarmina en el ambiente sinovial. S100A8/A9 presente en el microambiente sinovial de SpA contribuye a la producción de MMP-9. Este efecto podría ser directo o mediado por la IL-6 inducida por S100A8/A9. Además, el microambiente sinovial de SpA mejora la diferenciación de FS a miofibroblastos. Investigaciones adicionales podrían demostrar la participación de S100A8 en esta diferenciación de FS a miofibroblastos.

Objetivo 4. Investigar los mecanismos efectores inducidos por los diferentes LS empleando inhibidores de las cascadas de MAPKs y de Jak1/Jak3, y agentes biológicos como anti-receptor de IL-6, anti-TNF o anti-IL-17.

Participación de MAPKs y de Jaks en la secreción de IL-6 por FS inducida por LS de SpA. Las inhibiciones de Jak1/Jak3 no modificaron la producción de IL-6 en sobrenadantes de FS estimulados con el pool de SpA (Figura 16A). En contraste, MAPKs ERK y p38 redujeron significativamente la secreción de IL-6 (Fig. 16B).

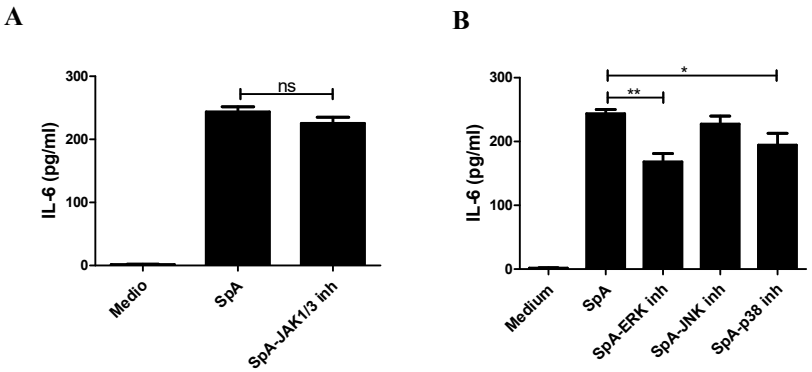


Figura 16. **Efecto del inhibidor Jak1/Jak3 o de MAPKs en la inducción de IL-6 en FS por LS de SpA.** Cultivos de FS de la línea SW982 fueron estimulados con el pool de LS de SpA durante 48h en ausencia o presencia del inhibidor Jak1/3 (Tofacinib, 1000 nM) (A), o de de inhibidores de ERK (PD98059, 25 mM), JNK (SP203580, 50mM) o p38 (SB203580, 25 mM) (B). En los sobrenadantes de 48 hs, la concentración de IL-6 fue determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo. ns: no significativo, *p<0,05; ** p<0,01.

Efectos de otras citoquinas inflamatorias en la secreción de IL-6 por FS inducida por LS de SpA. Se demostró que la presencia de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 (tocilizumab), anti-TNF (infliximab) o anti-IL-17 (secukinumab) inhiben significativamente la producción de IL-6 por FS estimulados por LS de SpA (Figura 17). Este efecto no fue detectado con el receptor TNFR2 soluble (etanercept).

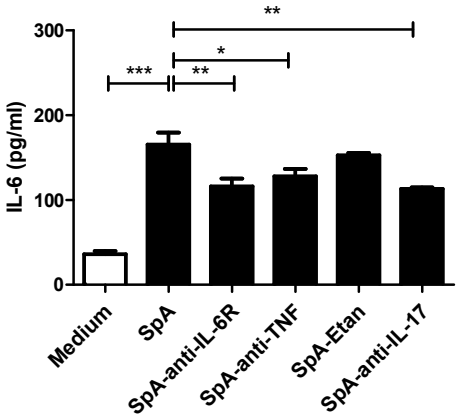


Figura 17. **Efecto de citoquinas inflamatorias en la inducción de IL-6 en FS por LS de SpA.** Cultivos de FS de la línea SW982 fueron estimulados con el pool de LS de SpA durante 48h en ausencia o presencia de anti-receptor de IL-6 (tocilizumab, 200□g/ml), anti-TNF (infliximab, 200□g/ml), receptor TNFR2 soluble (etanercept, 100□g/ml) o anti-IL-17 (secukinumab,100□g/ml). En los sobrenadantes de 48 h, la concentración de IL-6 fue determinada por ELISA. ns: no significativo, *p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001.

Efecto de la inhibición de Jak 1/3 en la actividad MMP-9 inducida por LS de SpA en FS. Se analizó la actividad de MMP-9 por zimografía (Figura 17A) y la concentración de MMP-9 por ELISA (Figura 18B) en sobrenadantes de cultivos de FS de la línea SW982 estimulados con el pool de SpA en ausencia o presencia del inhibidor Jak 1/3 (Tofacinib). Sorprendentemente, la inhibición de la señalización por Jak1/3 aumentó significativamente tanto la actividad MMP-9 en todas sus formas (monomérica, Pro-MMP-9, MMP-9 complejada con NGAL y dimérica) (Figura 18A), como así también la concentración de MMP-9 (Figura 18B) en el cultivo de células SW982 expuestas al microambiente sinovial de SpA. En contraste, la inhibición del receptor de IL-6 disminuyó significativamente la concentración de MMP-9 en los sobrenadants de cultivo

(Figura 18B), confirmando el rol de IL-6, presente en el microambiente sinovial de SpA, en la inducción de MMP-9 en FS.

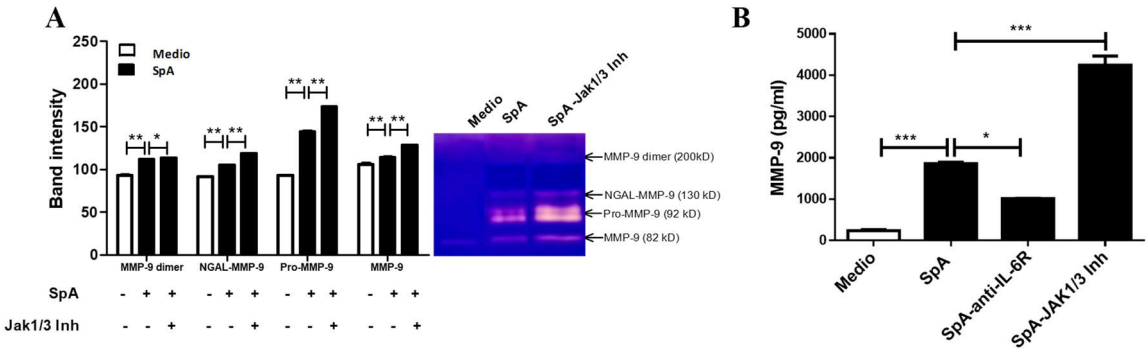


Figura 18. **Efecto del inhibidor Jak1/3 en la inducción de MMP-9 en FS por LS de SpA.** Cultivos de FS de la línea SW982 fueron estimulados con el pool de LS de SpA en ausencia o presencia del inhibidor Jak1/3 (Tofacinib, 1000 nM). En los sobrenadantes de 48 h, la actividad de MMP-9 en sus diferentes formas (monomérica, pro- MMP-9, MMP-NGAL, MMP-9 dimérica) fue evaluada por zimografía (A). Se muestra el análisis de intensidad de bandas realizado con el programa Image J y el zimograma correspondiente. También, la concentración de MMP-9 fue determinada por ELISA en los sobrenadantes luego de 48 h de estimulación de los FS con el pool de LS de SpA en ausencia o presencia del inhibidor Jak1/3 o del anticuerpo anti-receptor de IL-6 (B). *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Efecto de IL-6 sobre la inducción de IL-10 en FS. Para explicar si el incremento de MMP-9 por inhibición de Jak 1/3 es mediado por una disminución en la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, analizamos esta citoquina en los sobrenadantes de cultivo. Teniendo en cuenta que IL-6 al unirse a su receptor activa kinasas Jaks, analizamos primero, si IL-6 induce IL-10 y luego si en la misma participa Jak1. Demostramos que, en forma dosis-respuesta, IL-6 induce en FS la producción de IL-10 (Figura 19A), y que dicho efecto es reducido significativamente por inhibición con el anticuerpo anti-receptor de IL-6 o por inhibición de Jak1/Jak3 (Figura 19B).

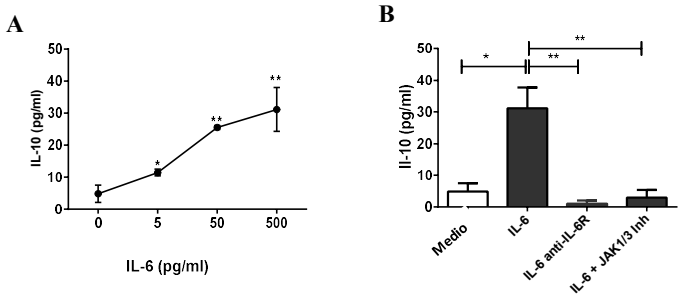


Figura 19. **Efecto de IL-6 en la inducción de Il-10 en FS.** En A, los FS de la línea SW982 fueron estimulados con diferentes concentraciones de IL-6 (5-500 pg/ml). Luego de 48 h, se evaluó en los sobrenadantes de cultivo la concentración de IL-10 por ELISA. En B, los FS de la línea SW982 fueron estimulados con IL-6 en ausencia o presencia del anticuerpo anti-receptor de IL-6 (200 □g/ml) o del inhibidor Jak1/Jak3 (JAK1/3, Tofacinib, 1000 nM). *p<0,05; **p<0,01, comparado con células sin estímulo que se muestra como concentración 0 pg/ml en la gráfica A y medio en la gráfica B.

Participación de MAPKs en la secreción de MMP-9 por FS inducida por LS de SpA. Se analizó la actividad de MMP-9 por zimografía (Figura 20A) y la concentración de MMP-9 por ELISA (Figura 19B). Las inhibiciones de MAPKs JNK y p38 redujeron significativamente la actividad de MMP-9 (Fig. 20A) en los sobrenadantes de cultivo de FS estimulados con LS de SpA. Del mismo modo, los inhibidores de ERK, JNK y p38 redujeron significativamente la concentración de MMP-9 (Fig. 20B) en estos cultivos.

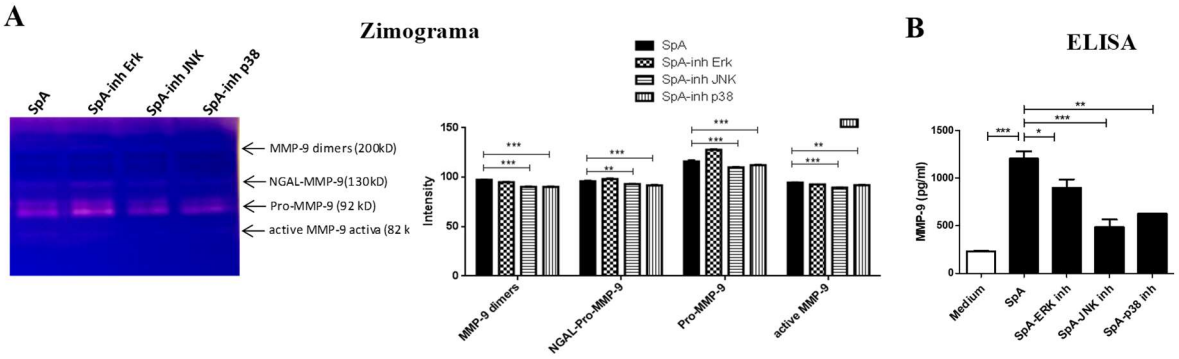


Figura 18. **Participación de la cascada de MAPKs en la inducción por LS de SpA de la producción MMP-9 por FS.** Los FS de la línea SW982 fueron estimulados con el pool de SpA en ausencia o presencia de inhibidores de ERK (PD98059, 25 mM), JNK (SP203580, 50 mM) o p38 (SB203580, 25 mM). En los sobrenadantes de 48 h de cultivo, se midieron la actividad de MMP-9 por zimografía (**A)**, y la concentración de MMP-9 por ELISA **(B)**. *p<0,05; ** p<0,01;*** p<0,001.

Conclusiones cuarto objetivo: Los resultados indican que TNF, IL-17 y la propia IL-6 mejoran la producción de IL-6 inducida por el LS de SpA, indicando una fina sincronización entre las citoquinas pro-inflamatorias en el microambiente sinovial. Demostramos que las MAPKs ERK y p38 participan en la producción IL-6 en el microambiente de SpA, y que IL-6 induce la secreción de MMP-9 en FS a través de las vías de MAPKs, especialmente p38 y JNK. Sin embargo, a través de la vía de Jak1, IL-6 regula la producción de MMP-9 por inducción de IL-10, sugiriendo un mecanismo de autoregulación por esta vía.

CONCLUSIONES FINALES

Nuestros resultados sugieren que el microambiente sinovial impacta en el fenotipo patogénico de los fibroblastos sinoviales, destacando el rol de alarminas como S100A8 en la inducción de IL-6, la cual cumple un rol patogénico a través de la inducción de MMP-9. De este modo, hemos descripto en espondiloartropatía un circuito patogénico que asocia S100A8, IL-6 y MMP-9. Las vías de señalización MAPKs participan en estas funciones patogénicas de FS. La cascada de Jak1 modula la inducción de MMP-9 por IL-6. Entender en profundidad estos mecanismos y circuitos patogénicos contribuye a proponer nuevos blancos terapéuticos, tal como S100A8.

Aportes: Nuestros estudios aportan datos sobre la influencia del microambiente sinovial en células con roles centrales en la patogenia de artropatías crónica. Los resultados contribuirán a dilucidar nuevos enfoques para limitar la activación persistente de FS y proponer blancos potenciales en futuras intervenciones terapéuticas dirigidos a cada artropatía inflamatoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. The danger from within: Alarmins in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12: 669-683.
2. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011; 377: 2115-2126.
3. Terenzi R, Monti S, Tesei G, Carli L. One year in review 2017: spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36: 1-14.
4. Smolen, J., Aletaha, D., Barton, A. et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4, 18001. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1
5. Van Tubergen, A.The changing clinical picture and epidemiology of spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 11: 110-118.
6. Lefevre S, Meier FM, Neumann E, Muller-Ladner U. Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 130-141.
7. Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med* 2010;16: 458-468.
8. Bayer C, Distler JHW. Changing paradigms in Spondyloarthritis: the myofibroblast signature. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 24-27.
9. Parks W C, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 617-629.
10. Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M, Pelletier JP. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43: 1134-1144.
11. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol* 2002; 169: 2643-2647.
12. Hunter CA, Simon A, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015; 16: 448-457.
13. Schoels MM, Van Der Heijde D, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, et al. Blocking the effects of interleukin-6 in rheumatoid arthritis and other inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and meta-analysis informing a consensus statement. *Ann Rheum Dis* 2012; 72 (4): 4.
14. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011;121: 3375-3383.
15. Hansson C, Eriksson C, Alenius GM. S-calprotectin (S100A8/S100A9): a potential marker of inflammation in patients with psoriatic arthritis. *J Immunol Res* 2014; 2014: 696415.
16. Mateos J, Lourido L, Fernández-Puente P, Calamia V, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteomics* 2012;75: 2869-2878.

17. Birkelund S, Bennike TB, Kastaniegaard K, Lausen M, Poulsen TBG, Kragstrup TW, et al. Proteomic analysis of synovial fluid from rheumatic arthritis and spondyloarthritis patients. *Clin Proteomics* 2020;17: 29. doi: 10.1186/s12014-020-09292-9.

18. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986;29: 1039-49.

19. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2010; 62:2569-2581.

20. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 777-783.

21. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:25-31.

22. Stebulis JA, Rossetti RG, Atez FJ, Zurier RB. Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *J Rheumatol* 2005; 32:301-306.

23. Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1985; 260: 2493-500.

24. Schreier T, Degen E, Baschong W. Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing. *Res Exp Med (Berl).* 1993; 193:195-205.

25. Oudhoff MJ, Kroeze KL, Nazmi K, van den Keijbus PA, van't Hof W, Fernandez-Borja M, Hordijk PL , Gibbs S, Bolscher JG, Veerman EC Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1000-fold *FASEB J* 2003;23: 3928-3935.

26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 1983; 65: 55-63.

27. Schorl C, Sedivy JM. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods* 2007; 41: 143-50.

28. Kuipers JG, Nietfeld L, Dreses-Werringloer U, Koehler L, Wollenhaupt J, Zeidler H, et al. Optimised sample preparation of synovial fluid for detection of Chlamydia trachomatis DNA by polymerase chain reaction. *Arth Rheum Dis* 1999; 58:103-108

29. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, Gaus K, Zreiqat H, Cai H, Lord RS, Geczy CL. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem* 2005; 16: 41521-41529.

30. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 349–363.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

- Presentación como poster en el 51° congreso Argentino de Reumatología del trabajo: **Proliferación de fibroblastos sinoviales estimulados con líquidos sinoviales de pacientes con espondiloartritis: rol de las citoquinas**. Di Genaro MS, Elicabe RJ, Blas R, Munarriz A, Pardo-Hidalgo R, Tamashiro H. Mendoza, 14-17 de noviembre de 2018. Publicado en Revista Argentina de Reumatologia (ISSN 0327-4411 impreso ISSN 2362-3675 electrónico, pag. 68.
- Presentación como poster en LXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología del trabajo: **Synovial microenvironment of spondyloarthritis impact on fibroblast-like-sinoviocyte: role of IL-6 and S100A8 protein.** Di Genaro MS, Elicabe RJ , Silva JE, Blas, R , Munarriz, A , Pardo-Hidalgo, R , Tamashiro H. Tucumán, 9-11 de octubre de 2019.
- Presentación como poster en 52° Congreso Argentina de Reumatología del trabajo: **Fibroblastos sinoviales en el microambiente sinovial de espondiloartritis: inducción de IL-6 por la proteína S100A8**. Blas R, Elicabe RJ, Munarriz, A, Pardo-Hidalgo, R , Tamashiro, Di Genaro MS. Salta, 16-19 de octubre de 2019. Trabajo con Mención especial.

TRABAJO EN PREPARACIÓN PARA SU PUBLICACIÓN

- Blas R, Eduardo Callegari, Eliçabe RJ, Páez MD, Munarriz A, Pardo-Hidalgo R, Tamashiro H, Di Genaro MS. **Synovial S100A8 alarmin induces IL-6 and metalloproteinase-9 production by synovial fibroblasts in peripheral spondyloarthritis**.

ABSTRACT

Different arthropathies are a major cause of disability for millions of adults. The most common arthropathies are osteoarthritis (OA), rheumatoid arthritis (RA) and spondyloarthritis (SpA). The purpose was to investigate the effects of synovial fluids (SF) of patients with OA, RA or SpA on phenotypic changes of synovial fibroblast (FS). We analyzed IL-6 production and MMP-9 activity, cell migration and proliferation. We performed a proteomic study to analyze synovial components associated with the pathogenic changes in FS. Molecular mechanisms and signaling pathways were also analyzed. We demonstrated that SF from patients with RA or SpA promotes early IL-6 secretion and sustained production of active MMP-9 in both primary and SW982 FS. The SpA synovial fluid induced in FS the myofibroblast characteristics: reduced FS migration, increased cell proliferation and α-SMA expression. Furthermore, treatment with anti-IL-6 receptor modulated the MMP-9 production in FS stimulated with SF of spondyloarthritis. The alarmin S100A8 was identified in a SF pool of SpA patients by a proteomic analysis. In addition, S100A8/A9 was detected in the cytoplasm of FS. This alarmin induced the production of IL-6 and MMP-9 by FS. We demonstrated that ERK and p38 MAPKs participate in the IL-6 secretion. Moreover, the p38 and JNK MAPKs pathways are involved in the IL-6-induced MMP-9 production by FS. However, Jak1 pathway regulated this MMP-9 production through IL-10 induction, suggesting a self-regulation mechanism. Our results suggest that the synovial microenvironment impacts on the phenotype and pathogenic role of synovial fibroblasts in SpA, highlighting the role of synovial alarmins such as S100A8 in the induction of IL-6, which could fulfill its pathogenic role through the induction of MMP-9. The results contribute to elucidate potential targets in future therapeutic interventions in chronic arthropathies.

ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C A LOS ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA *IN VITRO* E *IN VIVO* Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN ARGENTINA

Federico Alejandro Di Lello

Cátedra de Virología, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires. (FFyB - UBA)

INFORME FINAL

Se estima que el virus de la hepatitis C (HCV) infecta a más de 80 millones de personas en todo el mundo y un número considerable de estas desarrollan cirrosis o hepatocarcinoma [1]. El desarrollo de antivirales de acción directa (DAA), ha permitido un enorme incremento en las tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) en pacientes infectados crónicamente por HCV [2-5]. Sin embargo, se ha reportado la presencia de sustituciones asociadas a resistencia (RAS) que pueden causan una susceptibilidad disminuida a los DAA y juegan un papel importante en la recaída viral y el fracaso del tratamiento [3,6,7]. Por lo tanto, la presencia de RAS podría implicar un tema importante al considerar las opciones de retratamiento, especialmente cuando estas sustituciones están presentes en NS5A y/o en múltiples blancos de los DAA. De hecho, las últimas directrices de la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas recomiendan realizar una prueba de RAS en NS5A en pacientes infectados por HCV-1a para ser tratados con daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV) o elbasvir (EBV) [8]. Además, las RAS en NS5A poseen una gran eficacia biológica y tienden a persistir más tiempo en comparación con los RAS NS3 y NS5B [3,7]. En cuanto a los inhibidores de NS5B, S282T es la principal sustitución de resistencia detectada *in vitro* para sofosbuvir (SOF), aunque rara vez se ha detectado *in vivo* [9,10]. Además, después del tratamiento basado en SOF, se ha observado que las RAS L159F y V321A emergen en el 15% y el 5% de los pacientes, respectivamente. A pesar de estos datos, la información sobre la prevalencia de RAS en NS5A y NS5B en Argentina es muy limitada y las guías argentinas para el tratamiento del HCV se basan en datos de Estados Unidos y Europa.

Además, ante la limitación del sistema de replicón como modelo de ensayo *in vitro*, nuestro grupo ha colaborado en el desarrollo de un interesante sistema que permite estudiar la replicación del HCV en células mononucleares de sangre periférica (CMP) obtenidas de pacientes con infección crónica [11,12]. En este novedoso sistema desarrollado junto con la Sección Virología de la Academia Nacional de Medicina, se cultiva *in vitro* la población de CMP naturalmente infectadas con el virus del paciente y permite estudiar la replicación del HCV. Previamente, este sistema ha sido útil para demostrar: a) la existencia de infecciones mixtas (distintos genotipos

y/o subtipos) que estaban presentes en el cultivo de CMP, cuando en suero sólo se detectaba un genotipo de HCV [13], b) la presencia del virus en el cultivo de CMP, cuando no era detectable en suero [14], c) el desarrollo de un proceso evolutivo del HCV durante el cultivo de los CMP, cuando se analizaron y compararon muestras secuenciales [15].

OBJETIVOS DEL PROYECTO

-Determinar la prevalencia de sustituciones asociadas a resistencia a los DAA en pacientes crónicamente infectados por el HCV que van a iniciar el tratamiento con dichas drogas y analizar los factores asociados a la aparición de estas resistencias primarias.

-Evaluar la implicancia de las sustituciones asociadas a resistencia presentes en muestras basales y post tratamiento de los pacientes no respondedores al tratamiento con DAA.

-Caracterizar las relaciones filogenéticas entre las cepas del HCV de muestras de pacientes obtenidas en este estudio con las presentes en otras regiones geográficas para establecer como es la dispersión y origen de las RAS en nuestro país.

-Desarrollar un sistema experimental de cultivo de CMP, proveniente de pacientes infectados con el HCV que permita evaluar *in vitro* la emergencia de RAS que afecten la tasa de RVS.

-Determinar la cinética de aparición de RAS que afecten la actividad de sofosbuvir en cultivo de células mononucleares de sangre periférica, proveniente de pacientes infectados con el HCV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Seguimiento epidemiológico de RAS

Diseño del estudio

Estudio prospectivo de cohortes

Fases del estudio.

Se plantean ensayos en tres fases.

Fase 1: Se analizará la presencia de sustituciones asociadas a resistencia a los DAA en la proteína NS5A y polimerasa NS5B del HCV mediante PCR y secuenciación por Sanger [o *next generation sequence (NGS)* cuando sea requerido].

Fase 2: Se evaluará la asociación entre la presencia de mutaciones y las diferentes variables de estudio que se detallan más abajo.

Fase 3: Se evaluará la asociación entre la presencia de RAS antes del inicio del tratamiento y la tasa de respuesta viral sostenida así como también su presencia en las muestras post tratamiento de los pacientes no respondedores.

Sujetos de estudio.

Se incluirá una cohorte de más de 200 pacientes infectados crónicamente por HCV que concurren al Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno

"CEMIC".

Variables de estudio.

La variable primaria del estudio será la presencia de RAS a los DAA. Se analizarán también las siguientes variables explicativas de ajuste:

1. Variables demográficas: edad y género.

2. Variables relacionadas con la infección por el HCV: genotipo y subtipo del HCV, carga viral.

3. Variables relacionadas con la infección por el HIV (en co-infectados): la carga viral de HIV, niveles de células CD4+ y el tratamiento antirretroviral.

Procesamiento de las muestras.

A partir de 200µl de suero se purificará el ARN viral mediante la utilización de TRIZOL (*GibcoBRL*). Posteriormente, se hará la transcripción reversa con cebadores al azar (*Biodynamics)* durante 90 minutos a 37º C para obtener 40µl de ADNc.

Detección de las mutaciones de resistencia a las DAA.

Las mutaciones serán detectadas mediante la amplificación por la técnica de PCR convencional de las regiones que codifican para las proteínas virales NS5A y NS5B.

Las variantes que serán analizadas en todos los pacientes y para cada región se detallan a continuación:

-11 posiciones de la NS5A: 24, 28, 30, 31, 32, 38, 54, 58, 62, 92 y 93.

-7 posiciones de la polimerasa-NS5B: 142,159, 237, 282, 289, 320 y 321.

Todas estas posiciones han sido previamente asociadas con la resistencia al tratamiento [16].

Ensayos *in vitro.*

Fases del estudio.

Se plantean ensayos en dos fases.

Fase 1: Se determinará la concentración de SOF y DCV, a emplear en el cultivo de CMP. Para ello: se determinará la citotoxicidad de ambas drogas y se utilizará una concentración de droga antiviral no citotóxica y sub-inhibitoria de la replicación viral para el desarrollo de los ensayos de selección de resistencia.

Fase 2: Se evaluará la emergencia de mutantes resistentes en presencia de DAA en el cultivo de CMP mediante la secuenciación del HCV en la región de interés, obtenidos a diferentes tiempos.

Cultivo de CMP.

El cultivo será llevado a cabo según se describió previamente por Di Lello et al [15].

RESULTADOS

Ensayo in vivo.

Un total de 143 pacientes han sido incorporados en este estudio. Entre la población incluida 60,4% son hombres. Cincuenta pacientes (34,9%) están infectados por HCV-1a y 93 (65,1%) por HCV-1b.

Amplificación de las muestras basales de HCV (NS5A y NS5B).

Se realizó la extracción del ARN viral de todos los pacientes incorporados. Adicionalmente, se lograron amplificar 65 muestras para ambas regiones (NS5A y NS5B), 28 solo para NS5A y 15 solo para NS5B. Como resultado, se incluyeron en el estudio 93 secuencias de NS5A y 80 de NS5B.

Secuenciación de las muestras basales de HCV.

Los productos de la amplificación fueron purificados para poder ser luego secuenciados por Sanger. Todas las muestras amplificadas fueron exitosamente secuenciadas.

Posteriormente se analizaron la prevalencia de RAS y los resultados obtenidos se presentan a continuación:

Del total de las 93 muestras secuenciadas para NS5A, se observaron RAS en 24 (25,8%) pacientes infectados con HCV-1. Se observó una prevalencia inicial similar de RAS NS5A tanto para el HCV-1a como para el HCV-1b [23,3% vs. 27,0%, respectivamente ($p = 0,707$)].

Un solo paciente infectado con HCV-1b (1,6%) portaba simultáneamente dos RAS (Q54Y y A92T). Ninguno de los pacientes infectados con HCV-1a mostró más de un RAS ($p = 0,488$). Las RAS más frecuentemente observadas en HCV-1a fueron L31M (6,7%) y E62D (13,3%). En los aislados de HCV-1b, L31M (7,9%), QH54Y (3,2%), P58R / Q / L / S (6,4%) e Y93H (3,2%) fueron los más comúnmente detectados. NS5B: Cinco de los 80 (6,3%) pacientes infectados con HCV-1 presentaron los RAS en esta región. Ninguno de los 27 pacientes infectados con HCV-1a tenía RAS en NS5B. Por otro lado, 5 de 53 (9,4%) sujetos infectados con HCV-1b tenían RAS ($p = 0,099$). Los polimorfismos de NS5B identificados con mayor frecuencia al inicio del estudio fueron L159F (3,8%) y C316N (5,7%). Solo un paciente presentó un doble RAS (L159F y C316N). Al inicio del estudio, ninguno de los pacientes presentó la variante NS5B S282T.

En conclusión, a partir de los resultados obtenidos en este estudio se brinda información valiosa sobre el perfil genético de las RAS en NS5A y NS5B de Argentina. El análisis de la resistencia a los DAA asociada a las sustituciones naturales del HCV indica que los RAS naturales son bastante frecuentes en los aislados de HCV de pacientes sin tratamiento previo de Buenos Aires, Argentina. Este trabajo de investigación establece un punto de partida para futuros estudios tendientes a desarrollar un mapa global de RAS, ya que la prevalencia de RAS en NS5A y NS5B varía según la región geográfica analizada. En este sentido, el presente estudio respalda la necesidad de realizar más estudios de epidemiología molecular sobre RAS con el fin de ajustar las pautas de tratamiento local con la incorporación de datos autóctonos de más de 500.000 pacientes infectados por el HCV en Argentina.

Estos resultados fueron finalmente publicados en una revista con referato y el presente subsidio fue incorporado como fuente de financiación.

Martínez A, García G, Ridruejo E, Culasso ACA, Pérez P, Pereson MJ, Neukam K, Flichman DM, Di Lello FA. Prevalence of NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in *Naïve* Patients Infected with Hepatitis C Virus Genotype 1. *J Med Virol* 2019; 91(11):1970-1978.

Ensayo in vitro.

Al presente, se realizó el cultivo *in vitro* de las CMP de cuatro pacientes con infección crónica por este virus. En dos de ellos se cuantificó el ácido nucléico viral en el sobrenadante de cultivo, por RT-PCR en tiempo real, a los 3, 6 y 9 días de incubación. En los dos restantes, el tiempo de cosecha fue acotado a 1, 2 y 3 días de cultivo de las CMP. En los ensayos iniciales, la cuantificación viral fue mayor a los 3 días de cultivo, disminuyendo en los tiempos posteriores (6 y 9 días). En los estudios siguientes, se determinó que la máxima recuperación de partículas virales en el sobrenadante, ocurrió entre los 2 y 3 días de cultivo. Estos resultados preliminares, permitieron demostrar que el HCV alcanza la concentración máxima a los 3 días de cultivo con valores superiores a los límite de detección del método empleado (1500 UI/ml). Por otra parte, los cultivos se cuantificaron también mediante la detección del antígeno de Core de HCV con resultados similares a los observados para las cargas virales. Este resultado indica que las proteínas virales también fueron detectadas en el sobrenadante de cultivo.

Actualmente, se realizan nuevos ensayos para completar esta etapa del proyecto de investigación. Una vez concluida, a partir de los resultados obtenidos, se diseñará la siguiente etapa del proyecto, que consistirá en tratar los cultivos de CMP, con distintas concentraciones de Sofosbuvir y Daclatasvir, drogas antivirales ampliamente utilizadas en la actualidad para el tratamiento de la infección crónica por el HCV.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Hepatitis C fact sheet, update April 2017. Available at: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/ fs164/en/. Accessed 20 October 2020.

2. Zeuzem S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. N Engl J Med. 2011;364: 2417-2428.

3. Krishnan P, et al. Resistance analysis of baseline and treatment-emergent variants in hepatitis C virus genotype 1 in the AVIATOR study with paritaprevir-ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:5445-5454.

4. Asselah T, et al. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. Liver Int. 2016;36(Suppl 1):47-57.

5. Younossi ZM, et al. Sofosbuvir and velpatasvir with or without voxilaprevir in direct- acting antiviralnaïve chronic hepatitis C: patient-reported outcomes from POLARIS 2 and 3. Aliment Pharmacol Ther. 2018;47:259-267.

6. Poveda E, et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. Antiviral Res. 2014;108:181-191.

7. Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. J Hepatol. 2016;64:486-504.

8. AAEEH-Recomendaciones para el Tratamiento de la Hepatitis Crónica por virus C: Esquemas libres de Interferón: Indicaciones de Tratamiento. 2017. Available at: https://drive.google.com/file/d/0B4MPXfilZ_XaTnhOcmxEaGtGZmNMLWJOWkwwbjFZWX ZnMDVv/ view. Accessed 30 October 2020.

9. Lam AM, et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:3359-3368.

10. Svarovskaia ES, et al. Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis C virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. Clin Infect Dis. 2014;59:1666-1674.

11. Ruibal-Ares B, *et al*. Immortalized Epstein-Barr virus-positive B-cell lines obtained by prolonged culture of peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus type-1 positive patients. *J Hum Virol* 2001; 4: 200-213.

12. Baré P, *et al*. Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol* 2005; 86: 1717-1727.

13. Parodi C, *et al*. Evidence of occult HCV genotypes in hemophilic individuals with unapparent HCV mixed infections. *Haemophilia* 2008; 14: 816-822.

14. Parodi C, *et al*. Hepatitis C virus long-term persistence in peripheral blood mononuclear cells in patients with haemophilia. Detection of occult genotype 1. *J Viral Hepat* 2015; 22 (7):607-616.

15. Di Lello FA, *et al*. New evidence of replication of Hepatitis C virus in Short-Term Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures. *Virus Res* 2014; 13: 191: 1-9.

16. Kalaghatgi P, *et al*. Geno2pheno[HCV] - A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents. PLoS One. 2016; 11 (5):e0155869.

ABSTRACT

Direct acting antiviral (DAA) therapy against hepatitis C virus (HCV) increases sustained virologic response rates. Nevertheless, drug resistance has occasionally been associated with failure to DAA. However, the information about the prevalence of NS5A and NS5B resistance associated substitutions (RASs) in Argentina is very scarce. In this study, we determine the prevalence of NS5A and NS5B resistances to treatment in Argentinean DAA treatment naïve patients chronically infected with genotype 1 (HCV-1). In this retrospective cross-sectional study, 108 HCV-1 infected patients were studied. RASs in NS5A and NS5B were analyzed by Sanger at baseline and phylogenetic analysis was performed. NS5A and NS5B RASs were detected in 25.8% and 6.3% of the analyzed sequences, respectively. The most frequent primary RASs for NS5A were L31M (7.5%) and Y93H (3.2%) and for NS5B was L159F (3.8%). No association between the presence of RASs and the outcome of DAA treatment was found in this study. Additionally, most of the Argentinean samples were randomly distributed among sequences around the world in the phylogenetic analysis. Only one significant Argentinean cluster was observed in both regions but without any particular RASs pattern. Baseline RASs in NS5A and NS5B were frequently observed in HCV-1 infected patients from Buenos Aires, Argentina but not related to treatment outcome. No clusters related to RASs transmission were observed in the phylogenetic

analysis. The frequency of RASs detected in this study supports the need for more molecular epidemiology studies on RASs to adjust local treatment guidelines with the incorporation of autochthonous data.

METADONA COMO PRIMERA LÍNEA DE TRATAMIENTO DEL DOLOR POR CÁNCER. ANÁLISIS DEL PERIODO DE TITULACIÓN

Graciela Dran

Unidad de Cuidados Paliativos,
Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú

Los resultados obtenidos mediante este estudio conformaron un manuscrito que fue enviado para su evaluación y publicación a Journal of Palliative Medicine el 10 de noviembre de 2020.

Aclaración sobre un cambio en el periodo de estudio propuesto. A raíz de la pandemia Covid 19, la Unidad de CP del Hospital Tornú, donde se realizó este estudio, suspendió la admisión de pacientes y los médicos fueron afectados al área Covid. Los estudios de investigación en curso prácticamente se suspendieron.

Por esto, los resultados informados no se refieren al periodo de estudio propuesto originalmente (primer mes de tratamiento con opioides) sino que se limitó a la primera semana. No obstante, esta modificación, se pudo concretar el análisis meticuloso de una ventana fundamental del tratamiento con metadona, la titulación. Durante el inicio del tratamiento se titula el opioide, es decir, se realiza un incremento controlado de la dosis hasta alcanzar la estabilización de la dosis y el control del dolor. En el tratamiento con metadona y teniendo en cuenta su compleja farmacocinética, este constituye uno de los aspectos del tratamiento donde la evidencia es más escasa. Por lo tanto, si bien redujimos el periodo de análisis, el trabajo tiene la riqueza del registro diario de todas las variables (intensidad de dolor y otros síntomas, dosis de opioide, efectos adversos, etc.) durante una fase del tratamiento poco estudiada.

RESUMEN

Antecedentes. La metadona es un opioide fuerte de bajo costo que se utiliza cada vez más como tratamiento de primera línea para el dolor en cuidados paliativos (CP). Su vida media larga e impredecible y su fase de eliminación lenta pueden dificultar la titulación. La evidencia de las modalidades de titulación es escasa.

Objetivo. Describir la fase de titulación del tratamiento con metadona de primera línea en dosis bajas y utilizando metadona como opioide de rescate.

Métodos. Estudio prospectivo con pacientes vírgenes de opioides fuertes, con dolor oncológico moderado a severo, en seguimiento en una unidad terciaria de CP en Argentina. La dosis inicial de metadona fue de 2,5 a 5 mg /día cada 8, 12 o 24 horas. La titulación permitió aumentos de dosis diarios a partir del día 1 y la prescripción de metadona oral de 2,5 mg cada 2 horas con un máximo de 3 dosis de rescate /día para el dolor irruptivo. El control del dolor, la dosis de estabilización de metadona y los efectos adversos, entre otras variables, se evaluaron diariamente durante los primeros 7 días (T0 –T7).

Resultados. Se incluyeron 62 pacientes. La dosis inicial mediana (IQR) de metadona fue de 5 (2,5) mg/día. La intensidad del dolor disminuyó de una mediana (rango intercuartil) de 8 (2,3) en T0 a 4 (2,3) en T1 y permaneció ≤4 en T7 (todos p <0,0001 en comparación con T0). Se obtuvieron resultados similares a través de las escalas categóricas y de tolerabilidad del dolor. Cincuenta pacientes (81%) lograron el control del dolor, 66% en las primeras 48 horas. La dosis diaria de metadona en T2, T3 y T7 fue mayor que en T0: 7.5 (3), 6 (5) y 6.7 (5.5) versus 5 (2.5), respectivamente (p <0,05 en todos los puntos). El índice de escalada de opioides en T7 fue del 1,7%. La mediana del número de rescates, la dosis de estabilización y el tiempo de estabilización fueron 0 (1), 5 (4,5) mg y 3 (2) días, respectivamente. Un paciente fue suspendido por delirio. Todos los demás efectos secundarios fueron leves.

Conclusiones. La metadona como primera línea en dosis baja, utilizando metadona como rescate dio como resultado una disminución pronunciada y rápida del dolor, con una necesidad mínima de titulación, y sin evidencia de acumulación o sedación al final de la semana.

FIRST-LINE METHADONE FOR CANCER PAIN. TITRATION TIME ANALYSIS

Mammana Guillermo (1) and Bertolino Mariela (1) (both authors contributed the same), Bruera Eduardo (2), Orellana Fernando (1), Vega Fanny (1), Peirano Gabriela (1), Bunge Sofía (1,3), Armesto Arnaldo (4), Dran Graciela (5,6).

(1) Unidad de Cuidados Paliativos- Fundación FEMEBA, Hospital de Agudos Dr. E. Tornú, Buenos Aires, Argentina. (2) Department of Palliative, Rehabilitation, & Integrative Medicine, UT MD Anderson Cancer Center, Houston, TX USA. (3) Facultad de Ciencias de la Salud, UNICEN, Buenos Aires, Argentina. (4) Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. (5) Programa de Bioética, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO), Buenos Aires, Argentina. (6) Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET), Argentina.

CORRESPONDING AUTHOR: Graciela Dran

RUNNING TITLE: First-line methadone titration

KEYWORDS: advanced cancer; cancer pain; first-line methadone

Background. Methadone is a low-cost, strong opioid that is increasingly used as a first-line treatment for pain in palliative care (PC). Its long and unpredictable half-life and slow elimination phase can make titration challenging. Evidence for titration modalities is scarce.

Objective. To describe the titration phase of the treatment with low dose first-line methadone and the use of methadone for breakthrough pain.

Methods. Prospective study with strong opioid-naïve patients with moderate to severe cancer pain followed at a tertiary PC unit in Argentina. Starting methadone dose was 2.5-5 mg/day every 8, 12, or 24 hours. Titration allowed daily dose increases from day 1, and prescription of oral methadone 2.5 mg every 2 hours with a maximum of 3 rescue doses/day for breakthrough pain. Pain control, methadone stabilization dose, and adverse effects, among other variables, were daily assessed over the first 7 days (T0 –T7).

Results. 62 patients were included. Initial median (IQR) methadone dose was 5(2.5) mg/day. Pain intensity decreased from a median (IQR) of 8(2.3) at T0 to 4(2.3) at T1 and remained ≤4 at T7 (all $p<0.0001$ compared to T0). Similar results were obtained through the categorical and tolerability scales for pain. Fifty patients (81%) reached pain control, 66% in the first 48 hours. Methadone daily dose at T2, T3 and T7 were higher than that at T0: 7.5(3), 6(5) and 6.7(5.5) versus 5(2.5); respectively (all $p<0.05$). The opioid escalation index at T7 was 1.7%. The median (IQR) number of rescues, stabilization dose and time for stabilization were 0 (1), 5(4.5) mg and 3(2) days, respectively. One patient was discontinued due to delirium. All the other side effects were mild.

Conclusions. First-line, low-dose methadone using rescue methadone resulted in a pronounced and rapid decrease in pain, with minimal need for titration and for breakthrough doses, and no evidence of accumulation or sedation by the end of the week.

INTRODUCTION

Moderate to severe pain affects 70% to 90% patients with advanced cancer and requires strong opioids as main treatment[1]. Methadone is a synthetic strong opioid with several distinctive advantages in comparison to morphine and other long-lasting opioids. It has a fast-initial absorption-distribution phase with a rapid onset of analgesic effect, a long half-life that allows convenient administration intervals of 8 or 12 hours and a low rate of induction of tolerance and hyperalgesia[2,3,4]. Based on its pharmacokinetics, it is expected that most patients achieve dose stabilization within the first week of treatment[5]. Of special interest is its low cost, given the persistence of significant barriers to access to opioids in low- and middle-income countries (LMIC)[6]. However, methadone has complex pharmacological properties that has traditionally limited its use to specialized teams and mainly as a second or third line of treatment. A main concern relates to the variable and unpredictable half-life and slow elimination phase with the risk of accumulation and delayed toxicity[5,7], which can make titration challenging. In recent years, some studies began to document methadone´s safety and efficacy as a first line of treatment for cancer pain[8,9], in palliative care (PC) patients. Still there is limited evidence in relation to the modality of titration and the timing for pain control and dose stabilization[8]. Our aim was to describe the critical period of dose titration in patients treated with first line methadone for the management of cancer pain.

METHODS

Study design and patient eligibility.

Prospective single-center, observational study of first- line methadone titration during the first seven days of treatment for the management of cancer pain. All patients gave their informed consent to participate. This study was reviewed and approved by the Institutional Review Board and was granted by the National Cancer Institute and Fundación A. J. Roem mers, Argentina. All adult strong opioid-naïve patients who consulted to the PC unit (PCU) between 12/1/2016 and 9/30/2018 and initiated methadone for the treatment of moderate to severe cancer pain were included. All patients had normal cognition defined by the Memorial Delirium Assessment Scale (MDAS)[10] and life expectancy ≥4 weeks according to clinical judgment.

Methadone treatment.

Oral methadone starting dose was 2.5- 5 mg/day every 8, 12, or 24 hours. Elderly or frail patients were started with the lower doses (2.5-5 mg/day), while young patients with poor prognosis pain syndrome were started with the higher ones (10-15 mg/day). The titration regime allowed daily dose increases from day 1, and prescription of rescue oral methadone 2.5 mg every 2 hours with a maximum of 3 rescue doses/day for breakthrough pain. Methadone was discontinued due to the occurrence of a) limiting adverse effects, b) inability to take oral medication, c) cognitive impairment, d) patient lost to follow, or e) patient decision to discontinue the study.

Variable assessment.

Patients were monitored daily through ambulatory or telephone consultations for the first 7 days (T1-T7), which is the usual and acceptable time to titrate methadone dose against pain[5,11]. Main outcomes were achievement of control pain and stable methadone dose, number of rescues doses and presence of adverse effects (AE).

The pain syndrome was assessed both clinically and by using the Edmonton Staging System (ESS) classification for pain[12]. Pain intensity in the last 24 hours was determined through the numerical (from 0 to 10) and the categorical (from no pain to severe pain)[13] scales. A face validated tolerability scale was used to establish how tolerable the pain had been in the last 24 hours (from fully tolerable to intolerable pain). Controlled pain was considered when there was an improvement ≥30% or ≥2 points in the Edmonton Symptom Assessment System (ESAS) pain score[14,15], along with no to mild pain in the categorical scale or quite to fully tolerable pain in the tolerability scale, for at least 48 hours, in the absence of limiting AE. Additionally, patients were asked for their personalized pain goal (PPG) by identifying the maximal intensity of pain they would still consider comfortable[16].

The methadone daily dose was considered that prescribed plus rescues in the last 24 hours. The stabilization dose was considered that in which the patient could remain without requiring adjustment or requiring a variance in dose ≤20%, or ≤2 rescue doses/day, without limiting AE. Time to reach a stable daily dose was considered as the first day with stable dose[17]. The opioid escalation index as a percentage (OEI%) was calculated as [(MFD-MID)/MID)]/days x 100, where MFD and MID are methadone final and initial (indicated at T0) doses[11].

The presence of delirium (considered as ≥7 in MDAS)[18], hallucinations, myoclonus, constipation (considered as ≥3 days without bowel movements), other symptoms intensity evaluated through the ESAS, the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status[19], and the need for adjuvant medication, were also determined.

Statistics.

Demographics and baseline characteristics were summarized by descriptive statistics using median and range or median and interquartile range (IQR) for continuous variables and frequency and proportions for categorical variables. Medians were compared through the Mann Whitney and Wilcoxon signed rank tests. Percentages were compared through the χ^2 and Fisher exact test. Significance levels <0.05 were considered statistically significant. An intention-to-treat (ITT) analysis was performed, where all participants who met the inclusion criteria but did not complete the 7-day study period were considered as non-responders to pain control and included in the statistical analysis.

RESULTS

Patient characteristics and baseline assessments.

Sixty-two patients were included. Patient accrual is shown in figure 1. Prescribed median (range) methadone daily dose was 5.0 (2.5-10) mg with rescues of 2.5 mg. Patient demographics and medical characteristics at baseline (T0) are shown in table 1. Most were outpatients, with advanced cancer, predictors of poor response to opioids (ESS=2), pain score ≥4, and little tolerable to intolerable pain. Initial median (range) pain intensity was 8 (4-10) and the PPG was 2 (0-4). Irruptive pain was present in 11/62 patients (18%) with a median intensity of 7 (6-9). At admission, 14 patients (23%) were already on laxatives, 6 (10%) on antiemetics and 5 (8%) on corticosteroids. At the first consultation to the PCU, prescriptions increased to 84%, 97% and 32%, respectively, while prescription of NSAIDs diminished from 27% to 6%.

Follow up.

Fifty-five out of 62 patients who initiated methadone (89%) completed the 7-day observation period. Among the 7 patients who discontinued (11%), 1 was withdrawn due to neurotoxicity possibly induced by methadone (delirium) on day 5, 1 due to loss of oral route on day 4, and 1 due to delirium secondary to hypercalcemia on day 5. Four patients abandoned the protocol at their own decision on days 1, 1, 3 and 5. Reasons included frailty to answer questions, non-confidence to methadone or non-adherence.

According to the ITT analysis where those patients who discontinued the study were considered to have failed, pain control was achieved in 50/62 patients (81%), 33 of them (53%) at T1, 8 (13%) at T2, 3 (5%) at T3, 5 (8%) at T4 and 1 (2%) at T5. Of the patients who completed the study, 5 (8%) did not reach controlled pain. Three of them remained with mild or no pain and quite to fully tolerable pain along the whole week, although without reaching the criteria for controlled pain. The remaining 2 had not achieved pain control by day 7. Subsequent follow-up of these 2 patients showed that one of them achieved a pain ESAS score=2 at day 14 while the other was still in high pain by day 28 (data not shown).

From T1, there was a significant decrease in patients reporting pain intensity ≥4, moderate to severe pain or little tolerable to intolerable pain (table 2). Twenty-two patients (35%) reached their PPG; another 14 (23%) achieved a pain score equal to their expressed PPG plus one point. Median (range) ESAS score for pain decreased from 8 (4-10) at T0 to 4 (0-9) at T1 and remained ≤4 until T7 (all time points $p<0.0001$ compared to baseline) (figure 2A).

Variation in methadone daily dose is shown in figure 2B. Median (range) methadone daily dose at T2, T3 and T7 were significantly higher than that at T0 [7.5 (2.5-19.5), 6 (2.5-17.5) and 6.75 (1.25-21) versus 5 (2.5-10); $p=0.0479$, $p=0.0006$ and $p=0.0009$, respectively]. The OIE at T7 was 1.7%. The maximum individual dose was 21 mg/day, and the median (range) number of rescues was 0 (0-3) (n=374 determinations). Among patients who reached controlled pain, the median (range) stabilization dose was 5 (2.5-17.5) mg/day and the median time for stabilization was 3 (1-5) days.

Median ESAS scores for other symptoms are shown in table 3. Nausea and drowsiness remained low. Asthenia, anxiety, depression, dyspnea, insomnia, and wellbeing significantly decreased from T1 or T3. During the study period, sustained (≥3 consecutive days) and severe (ESAS ≥7) nausea and drowsiness were present in 4 (6%) and 19 (31%) patients, respectively. Constipation was seen in 13 patients (21%). Two patients (3%) had delirium (one of them associated with hypercalcemia) determining rotation to morphine. Hallucinations were present in 10 (16%), and myoclonus in 13 (21%), all of them isolated and not clinically relevant. No coma events nor respiratory depression occurred.

Throughout the study period, between 39 and 41 patients (63-66%) received laxatives, 28-32 (45-52%) antiemetics, 11-16 (18-26%) corticosteroids, 14-17 (23-27%) benzodiazepines and 14-19 (23-31%) acetaminophen. Other medication included pregabalin, antidepressants, NSAIDs and levomepromazine in 1 to 7 patients (2-11%). Median (range) ECOG performance status score was 2 (1-3) for every time point.

DISCUSSION

A comprehensive evaluation of the titration phase during first-line methadone treatment of cancer pain is provided. A growing number of studies report the successful use of methadone as a first line opioid[8]. Moreover, it has been proposed that methadone titration might be easier and safer in strong opioid naïve patients than in patients rotated from other strong opioid to methadone[11,20]. However, a recent revision of studies addressing the use of first line methadone concluded that information about the modalities of dose titration is still insufficient[8], with only few studies that particularly analyze this phase. In 1986, Ventafridda and colleagues showed that methadone average dose remained unchanged from the beginning of the treatment while the doses of morphine had to be consistently increased[21]. In contrast, another comparative study showed that methadone initially required more up and down changes in doses before achieving stabilization than morphine, suggesting a more difficult dose titration[11]. Bruera and colleagues found a higher rate of dropouts due to opioid-induced side effects (mainly sedation) during titration with methadone than with morphine[20]. Palat and colleagues[22] described their method for methadone titration in the outpatient setting which allowed dose increases of no more than 5 mg every 5–7 days, according to the patient's response.

The latest reviews in methadone[5,7] advise a strategy of slow titration without dose increase in the first 5 to 7 days, along with the use of shorter-acting opioid medication for breakthrough pain. Such scheme is based on methadone´s pharmacokinetics where the steady state is supposed to be achieved after 5-7 days and it is mainly supported by studies in drug dependence and methadone maintenance therapy[23,24]. Our modality for titration allowed early dose increases from Day 1, in accordance with previous reports where the steady state was achieved in less than 5 days[25], together with the use of rescue methadone for breakthrough pain. The feasibility of this more aggressive titration method is based on our previous positive experience[26] and the possibility for a close daily supervision of patients.

Using this scheme, we found minimal need for titration and for breakthrough doses, and no evidence of accumulation or sedation by the end of the week. The time to achieve dose stabilization (3 days) was comparable to previous reports[11]. The highest median methadone daily dose administered (7.5 mg/day) was lower than the initial doses used in most of the preceding studies[11,15,20,21,27-29], and the OEI was similar or lower[11,29-31]. These findings suggest that the methadone dose remained low and stable over the analyzed period, and that the increases, despite their statistical significance, had not clinical relevance. It should be considered that the overall increase in dose at the end of the week was equivalent to approximately 10 mg morphine[32].

In the present study, multiple and strict pain reduction and pain control criteria were used. Pain control was determined through the combination of both numerical and categorical scales. The tolerability scale, on the other hand, relies on the patients' subjective experience of pain alleviation. Sometimes, the patient's tolerance to pain, and not the numerical score, guided the physician's decision to increase the opioid dose. We observed a drastic decrease of the median intensity of pain from 8 to 4 after the first day on methadone, which was paralleled by the other scales. At the individual level, 50 patients (81%) reached pain control, most of them in the first 48 hours, and 36 (58%) reached an intensity of pain they considered still comfortable +/- 1 point. It is worth to say that a substantial percentage of patients (35%) expressed high expectations, with desired values of 0 or 1.

There was only one case of limiting neurotoxicity (delirium) that determined rotation to morphine. In a previous study, methadone as compared to morphine produced more adverse effects and dropout rate, particularly during the first 8 days[20]. Authors raised the possibility that the relative higher starting doses of methadone (median of 15 mg/day) or the utilization of methadone as a breakthrough opioid may have accounted for the higher toxicity. In this sense, the low initial methadone dose used in the present study could justify the low toxicity, despite the use of methadone rescues.

There were also few cases of severe nausea and constipation. In addition to methadone´s lower induction of nausea and constipation in comparison to other opioids[11,15,20,31], there was a substantial prescription of adjuvant laxatives and antiemetics at admission. Other symptoms accounting for the moderate to high initial symptom burden, namely asthenia, wellbeing, and anxiety, also significantly decreased from Day 1.

A considerable percentage of patients (6%) withdrew from the study at their own decision, none of them due to uncontrolled pain. The underlying reasons were the patient's ability or willingness to continue. In addition to the progression of the disease, aversion to opioids for presumed side effects (opiophobia, bad press), reluctance to participating in research protocols, and lack of confidence with a team they were meeting

for the first time, may have accounted for this result, and would probably have affected continuity in protocols with other opioids as well.

The major weaknesses of this study include the relatively small sample size and the high rate of patient discontinuation. A high attrition rate is intrinsic to PC trials[33]; so being able to access a larger initial sample would be essential. In addition, further studies are necessary to evaluate the OEI and adverse effects beyond the first week with this modality of treatment.

CONCLUSION

It can be concluded that the first week of treatment with low dose methadone, including the use of methadone for breakthrough pain, and mainly in the outpatient setting resulted in a rapid pain control with no need for significant titration in most patients. Despite the need for precaution, methadone is a desirable alternative to morphine for LMIC with limited opioid alternatives. Present evidence for its convenient and safe titration can significantly improve its accessibility and help to overcome existing inequities in pain alleviation in these countries.

DISCLOSURES AND ACKNOWLEDGMENTS. The authors declare no conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article. The authors acknowledge the National Cancer Institute of Argentina and Fundación A. J. Roemmers, Argentina, for the financial support for the research.

REFERENCES

1. van den Beuken-van Everdingen MH, Hochstenbach LM, Joosten EA, Tjan-Heijnen VC, Janssen DJ. Update on prevalence of pain in patients with cancer: systematic review and Meta-analysis. J Pain Symptom Manage 2016;51:1070-1090.
2. Salpeter SR, Buckley JS, Bruera E. The use of very-low-dose methadone for palliative pain control and the prevention of opioid hyperalgesia. The use of very-low-dose methadone for palliative pain control and the prevention of opioid hyperalgesia. J Palliat Med 2013;16(6):616-622.
3. Good P, Afsharimani B, Movva R, et al. Therapeutic challenges in cancer pain management: a systematic review of methadone. J Pain Palliat Care Pharmacother 2014;28:197–205.
4. Sunilkumar MM, Lockman K. Practical pharmacology of methadone: A long-acting opioid. Indian J Palliat Care 2018;24:10-14.
5. McPherson, M. L., Costantino, R. C., & McPherson, A. L. (2018). Methadone. Maximizing Safety and Efficacy for Pain Control in Patients with Cancer. Hematol Oncol Clin N Am 2018;32(3),405–415.
6. De Lima L, Pastrana T, Radbruch L, Wenk R. Crosssectional pilot study to monitor the availability, dispensed prices, and affordability of opioids around the globe. J Pain Symptom Manage 2015;48(4):649–659.

7. McPherson MK, Walker KA, Davis MP, Bruera E, et al. Safe and Appropriate Use of Methadone in Hospice and Palliative Care: Expert Consensus White Paper. J Pain Symptom Manage 2019; 57(3):635-645
8. Mercadante S, Bruera E. Methadone as a First-Line Opioid in Cancer Pain Management: A Systematic Review. J Pain Symptom Manage 2018;55(3):998-1003.
9. Madden K, Mills S, Dibaj S, Williams JL, Liu D, Bruera E. Methadone as the Initial Long-Acting Opioid in Children with Advanced Cancer. J Palliat Med 2018;21(9):1317-1321.
10. Breitbart W, Rosenfeld B, Roth A, Smith MJ, Cohen K, Passik S. The Memorial Delirium Assessment Scale. J Pain Symptom Manage 1997;13(3):28-37.
11. Mercadante S, Porzio G, Ferrera P, et al. Sustained-release oral morphine versus transdermal fentanyl and oral methadone in cancer pain management. Eur J Pain 2008 12:1040–1046.
12. Fainsinger RL, Nekolaichuk C, Lawlor P, et al. An International Multicentre Validation Study of a Pain Classification System for Cancer Patients. Eur J Cancer 2010;46(16): 2865-2866.
13. Paul SM, Zelman DC, Smith M, Miaskowski C. Categorizing the severity of cancer pain: further exploration of the establishment of cutpoints. Pain 2005;113:37–44.
14. Farrar JT, Portenoy RK, Berlina JA, Kinman JL, Strom BL. Defining the clinically important difference in pain outcome measures. Pain 2000;88:287-294.
15. Parsons HA, de la Cruz M, El Osta B, et al. Methadone initiation and rotation in the outpatient setting for patients with cancer pain. Cancer 2010;116:520-528.
16. Hui D and Bruera E. A Personalized Approach to Assessing and Managing Pain in Patients with Cancer. J Clin Oncol 2014;32:1640-1646.
17. Mercadante S. Switching Methadone: A 10-Year Experience of 345 Patients in an Acute Palliative Care Unit. Pain Medicine 2012;13:399–404
18. Lawlor PG, Nekolaichuk C, Gagnon B et al. Clinical utility, factor analysis, and further validation of the Memorial Delirium Assessment Scale in patients with advanced cancer: Assessing delirium in advanced cancer. Cancer 2000;88:2859–2867.
19. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and Response Criteria of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982;5:649-655.
20. Bruera E, Palmer JL, Bosnjak S, et al. Methadone versus morphine as a first-line strong opioid for cancer pain: a randomized, double-blind study. J Clin Oncol 2004; 22(1):185-192.
21. Ventafridda V, Ripamonti C, Bianchi M, Sbanotto A, De Conno F. A randomized study on oral administration of morphine and methadone in the treatment of cancer pain. J Pain Symptom Manage 1986;1:203-207.
22. Palat G, Chary S. Practical Guide for Using Methadone in Pain and Palliative Care Practice. Indian J Palliat Care 2018;24(Suppl 1):21-29.

23. Chou R, Cruciani RA, Fiellin DA, et al. Methadone safety: a clinical practice guideline from the American Pain Society and College on Problems of Drug Dependence, in collaboration with the Heart Rhythm Society. J Pain 2014;15:321.
24. Baxter LE, Sr., Campbell A, Deshields M, et al. Safe methadone induction and stabilization: report of an expert panel. J Addict Med 2013;7:377-386.
25. Mercadante S, Bianchi M, Villari P, Ferrera P, Casuccio A, Fulfaro F, Gebbia V. Opioid plasma concentration during switching from morphine to methadone: preliminary data. Support Care Cancer 2003;11(5):326-331.
26. Peraino GP, Mammana GP, Bertolino MS, et al. Methadone as first-line opioid treatment for cancer pain in a developing country palliative care unit. Support Care Cancer 2016; 24:3351-3356.
27. De Conno F, Groff L, Brunelli C, Zecca E, Ventafridda V, Ripamonti C. Clinical experience with oral methadone administration in the treatment of pain in 196 advanced cancer patients. J Clin Oncol 1996;14:2836-2842.
28. Mercadante S, Sapio M, Serretta R, Caligara M. Patient controlled analgesia with oral methadone in cancer pain: preliminary report. Ann Oncol 1996;7:613-617.
29. Mercadante S, Casuccio A, Agnello A, Barresi L. Methadone response in advanced cancer patients with pain followed at home. J Pain Symptom Manage 1999;18:188-192.
30. Mercadante S, Casuccio A, Agnello A, Serretta R, Calderone L, Barresi L. Morphine versus methadone in the pain treatment of advanced cancer patients followed up at home. J Clin Oncol 1998;16:3656-3661.
31. Haumann J, Geurts JW, van Kuijk SM, B Kremer, Joosten EA, van den Beuken-van Everdingen MJ. Methadone is superior to fentanyl in treating neuropathic pain in patients with head-and-neck cancer. Eur J Cancer 2016;65:121-129.
32. Walker PW, Palla S, Pei BL et al. Switching from methadone to a different opioid: what is the equianalgesic ratio? J Palliat Med 2008;11(8):1103-1108.
33. Hui D, Glitza I, Chisholm G, Yennu S, Bruera E. Attrition Rates, Reasons, and Predictive Factors in Supportive Care and Palliative Oncology Clinical Trials. Cancer 2013;119:1098-1105.

CORRESPONDING AUTHOR

Graciela Dran

Programa de Bioética, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO), Buenos Aires, and Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET), Argentina. E-mail: gdran@conicet.gov.ar; gcolodran@gmail.com

Table 1. Patient demographics and baseline medical characteristics.

N=62	N	%
Median age (range)	61 (32-85)	
Men	32	52%
Outpatients	54	87%
1st consultation to the PCU	44	71%
Previous history of drug addiction	8	13%
CAGE[a] (+)	9	15%
TUMOR SITE:		
Gastrointestinal	16	26%
Lung	14	23%
Breast	9	15%
Prostate	6	10%
Other/Unknown	17	26%
TUMOR STAGE:		
Advanced	56	90%
Localized	1	2%
Unknown/Under study	5	8%
TREATMENT:		
Active	27	44%
Under study	27	44%
Inviable/Discontinued	8	13%

PREVIOUS ANALGESIA:		
No opioids (acetaminophen/NSAIDS)	35	56%
Mild opioids (tramadol-codeine)	27	44%
TYPE OF PAIN:		
Nociceptive	41	66%
Mixed	19	31%
Neuropathic	2	3%
PAIN INTENSITY:		
ESAS[b] score ≥4	61	98%
Moderate to severe pain	62	100%
Little tolerable to intolerable pain	52	84%
ESS[c] = 2	37	60%
ECOG[d] = 3 or 4	25	40%

ESAS[b] score	Median (IQR)
Pain	8 (2)
Nausea	0 (0)
Drowsiness	3 (5)
Asthenia	7 (2.2)
Anxiety	4 (6)
Depression	3 (5)
Appetite	5 (8)
Dyspnea	0 (2.3)
Insomnia	3.5 (8)
Wellbeing	5 (4)

[a]: CAGE Questionnaire: screening for potential problems with alcohol.
Abbreviations: [b]: Edmonton Symptom Assessment System. [c]: Edmonton Staging System. [d]: Eastern Cooperative Oncology Group scale for performance status. IQR: interquartile range.

Table 2. Pain intensity at days 0, 1, 3 and 7 on methadone assessed through the numerical, categorical and tolerability scales. Intention-to-treat analysis.

	T0	T1	T3	T7	T1vsT0	T3vsT0	T7vsT0
	Number (%) of patients				P (Fisher Exact test)		
Pain intensity ≥4	61(98%)	28(45%)	18(29%)	25(40%)	*<0.0001*	*<0.0001*	*<0.0001*
Moderate to severe pain	62(100%)	12(19%)	13(21%)	14(23%)	*<0.0001*	*<0.0001*	*<0.0001*
Little tolerable to intolerable pain	52(84%)	10(16%)	9(15%)	14(23%)	*0.0001*	*<0.0001*	*0.0001*

Table 3. Median methadone daily dose (mg/day) and Edmonton Symptom Assessment System score for symptoms in the precedent 24 hours, assessed at days 0, 1, 3 and 7 on methadone.

	T0	T1	T3	T7	T1vsT0	T3vsT0	T7vsT0
	Median (IQR)				P (Wilcoxon test)		
Asthenia	7 (3.8)	5 (5)	3 (7)	3 (6)	*0.006*	*0.0003*	*<0.0001*
Nausea	0 (0)	0 (3)	0 (0)	0 (0)	0.9714	0.1079	0.4795
Anxiety	4 (7)	0 (4)	0 (4)	0 (2)	*0.0018*	*0.0033*	*<0.0001*
Depression	3 (5.5)	0 (5)	0 (0)	0 (0.5)	0.2102	*0.005*	*0.0013*
Drowsiness	3 (5)	1 (5)	0 (4)	0 (5)	0.2358	0.0849	0.3652
Dyspnea	0 (2.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.1549	*0.0097*	*0.0265*
Insomnia	3.5 (8)	0 (4.3)	0 (0)	0 (0)	*0.0009*	*<0.0001*	*<0.0001*
Appetite	5 (8)	4 (6)	4 (5)	4 (5)	0.2824	0.0503	*0.0278*
Wellbeing	5 (4)	4 (3)	3 (4)	2 (3.5)	*0.0015*	*0.0003*	*0.0003*

Abbreviations: IQR: interquartile range.

Figure 1. Patient accrual flow chart.

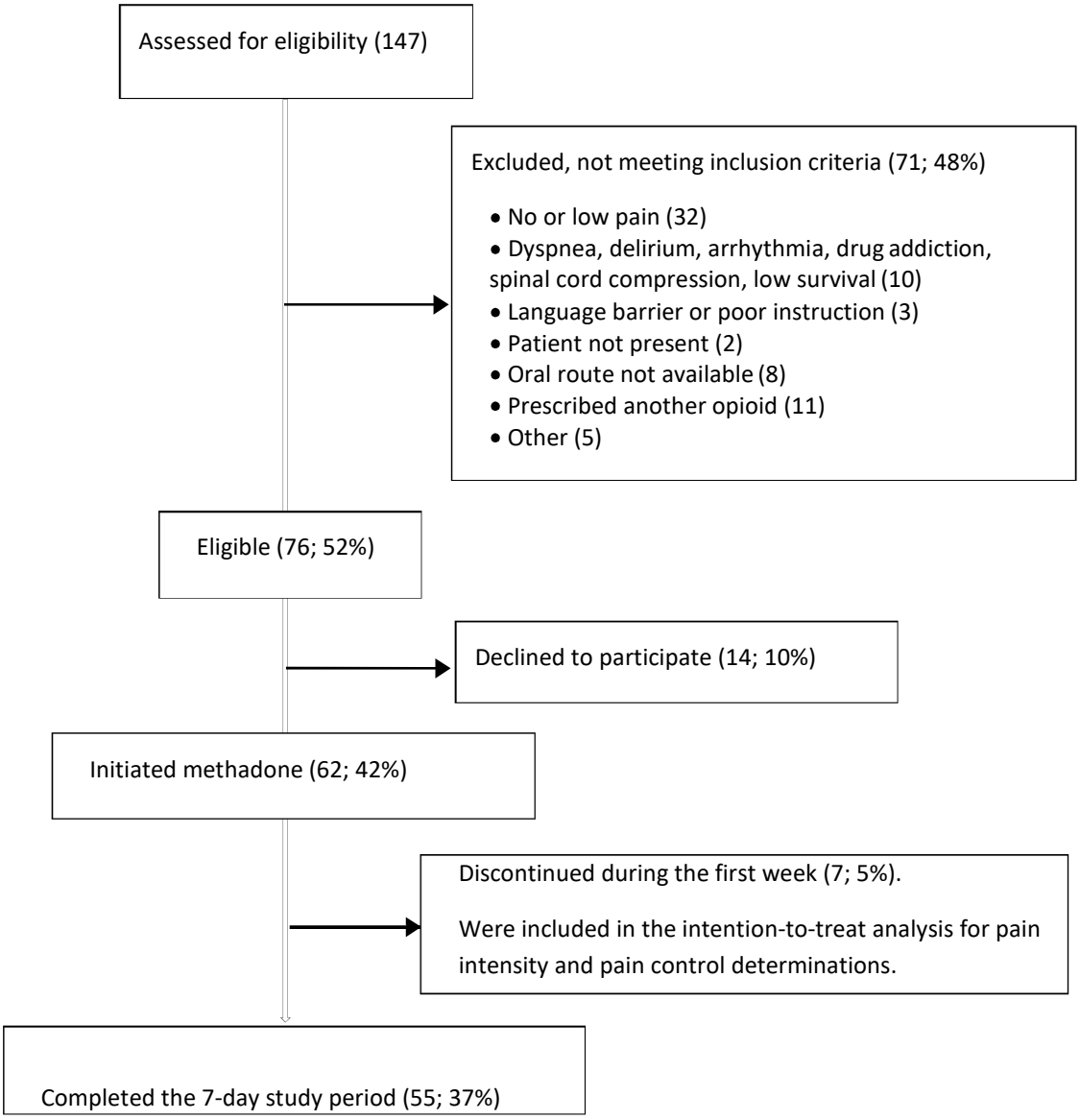
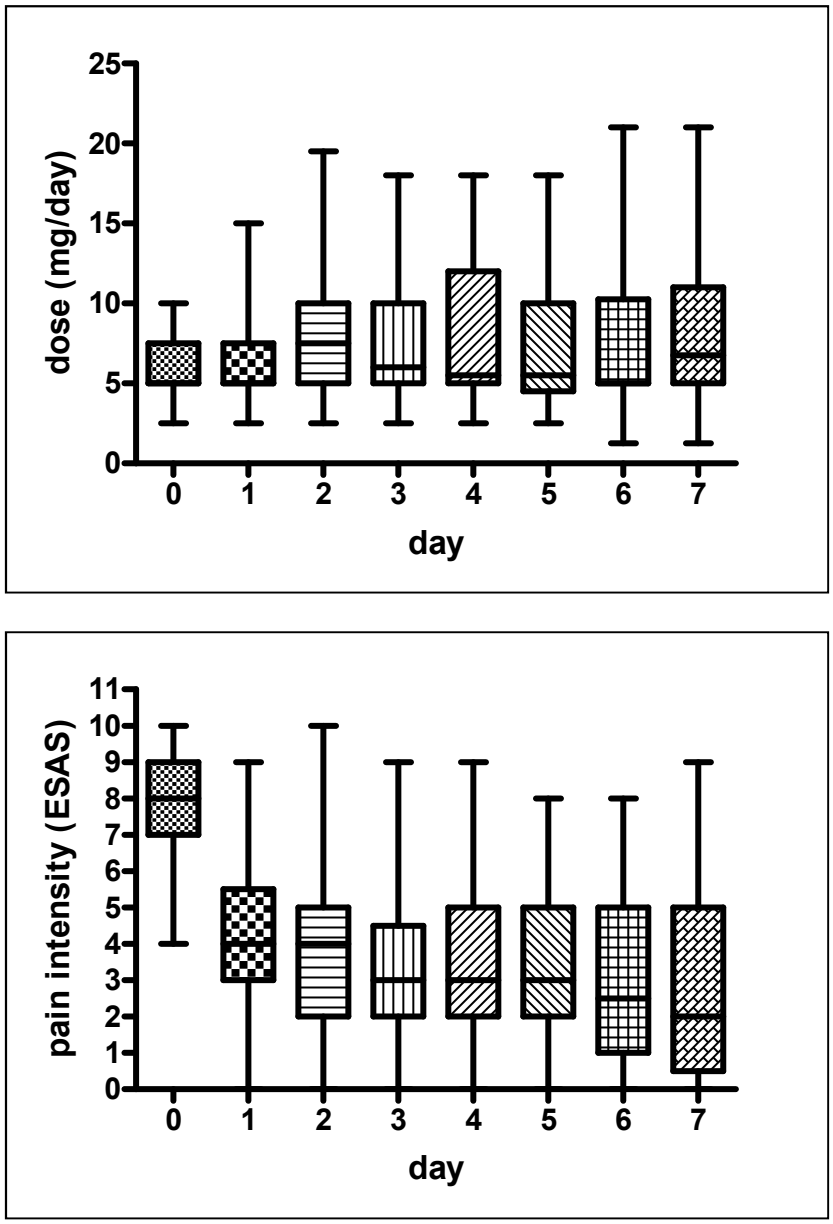


Figure 2. Variations in median ESAS score for pain (A) and in median methadone daily dose (B) during the 7-day study period.



ESTUDIOS GENÉTICO MOLECULARES EN ATAXIA DE FRIEDREICH

Lucía D. Espeche, Ignacio H. Castro, Liliana Dain, Javier Santos

Centro Nacional de Genética Médica "Dr. Eduardo E. Castilla", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Translacional, iB3, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FBMC), Facultad de Cs. Exactas y Naturales (UBA)

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades con base total o parcialmente genética ocupan un lugar cada vez más preponderante en la agenda sanitaria mundial y nacional. La genética clínica ha adquirido una gran relevancia, a consecuencia de los avances en el desarrollo de las técnicas diagnósticas, las cuales han tenido un enorme impacto en la práctica médica. Avanzar en el conocimiento de las variantes genéticas que se relacionan con una enfermedad, y conocer el mecanismo molecular que implican, permite avanzar en un posible tratamiento específico, o en su defecto, en su prevención.

Un tipo de variante genética de especial interés es la expansión de repeticiones. Se conocen más de 40 enfermedades causadas por la expansión de repeticiones (mayormente tripletes) dispersas por todo el genoma [1].

La Ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM #229300) es una enfermedad neuro y cardiodegenerativa poco frecuente que constituye la ataxia autosómica recesiva más frecuente. Algunos autores estiman su frecuencia en 1 en 50.000 individuos [2–4] y una frecuencia de portadores de 1 en 90 en población caucásica [5, 6]. Los síntomas usualmente comienzan en la adolescencia, con una edad media de 15,5 años (con un DS de 8 años) con una marcha inestable [7]. El cuadro clínico es lentamente progresivo y se caracteriza por disartria, ataxia de miembros superiores e inferiores, escoliosis, pie cavo, dificultades en la visión y la deglución, y trastornos cardiovasculares [8, 9].

La base molecular de la patología consiste en una disminución de la cantidad o pérdida de la función de la proteína frataxina (FXN) [10]. En aproximadamente el 96% de los casos, la expansión (cantidad de repeticiones mayor a 66) homocigota de un triplete GAA ubicado en el intrón 1 del gen *FXN* conduce a menores niveles de ARN mensajero (ARNm) y de FXN madura [11]. El 4% restante de los individuos que padecen FRDA son heterocigotas compuestos, con uno de los alelos con una expansión del triplete GAA y una variante puntual patogénica en el otro [12].

Muchos de los pacientes poseen una sospecha diagnóstica clínica pero no la confirmación molecular de su afección. Teniendo en cuenta que en algunos casos la sintomatología se superpone con otras ataxias espinocerebelosas, el diagnóstico de certeza es importante para un correcto asesoramiento familiar y la posibilidad de un tratamiento que posibilite una mejor calidad de vida a los afectados.

Por su baja prevalencia, en nuestro país, son muy escasos los laboratorios, tanto públicos como privados, que han implementado el diagnóstico molecular de esta patología. Es por ello, que uno de los objetivos de este proyecto fue estudiar una población de pacientes con FRDA y establecer un protocolo de diagnóstico molecular en el ámbito de la salud pública. La posibilidad de implementar estos estudios contribuiría a generar conocimiento sobre las características genotípicas de pacientes con FRDA de nuestra población y reportar variantes nuevas en la secuencia del gen *FXN* si fueran halladas. Por otro lado, permitiría brindar el diagnóstico etiológico definitivo del afectado, proveer información al equipo médico y a la familia sobre su pronóstico y promover el desarrollo de protocolos y algoritmos diagnósticos moleculares para la FRDA. Desde el punto de vista de la salud pública contribuiría a desarrollar el diagnóstico de esta patología en una institución pública a los efectos que todos los afectados puedan acceder al estudio molecular de la misma y brindar asesoramiento genético con el objetivo de implementar aquellas medidas que contribuyan a una mejor calidad de vida de los afectados.

En este proyecto, además, nos propusimos estudiar el impacto de tres variantes de secuencia en la proteína frataxina. El análisis de la implicancia molecular de variantes puntuales en la proteína permite explorar la relevancia de determinados residuos en su función y estabilidad y contribuyen a un mejor entendimiento de la relación genotipo/fenotipo de esta patología.

MÉTODOS

Estudio del número de repeticiones GAA y detección de expansiones.

Muestra: para la puesta a punto de la metodología de estudio del número de repeticiones se analizaron 13 individuos (pacientes y familiares portadores). Una vez logrado este paso, se comenzó el estudio de pacientes derivados por médicos neurólogos y genetistas. El criterio de inclusión consistió en la sospecha clínica de FRDA. Se confeccionó una ficha para recabar los datos clínicos relevantes de cada paciente, a ser completada por el médico derivante en cada caso. Todos los pacientes incluidos consintieron a la realización del estudio y firmaron un consentimiento informado elaborado para el presente proyecto y aprobado por el Comité de Ética del CNGM.

Metodología: para todas las muestras se realizó una extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica mediante la técnica de "salting out"[13]. El análisis del número de tripletes en el intrón 1 del gen *FXN* se realizó mediante PCR utilizando la polimerasa de alta procesividad Expand Long de Roche y cebadores específicos [14], uno de ellos marcado con el fluorocromo FAM.

Para la detección de mutaciones completas (expansiones) refractarias a la amplificación por PCR se implementó una TP-PCR con la utilización de un cebador específico y cebadores para las regiones repetitivas, uno de ellos marcado con FAM: GAA-F 5′-GGGATTGGTTGCCAGTGCTTAAAAGTTAG-3′, TP-P3-ATXF 5' AGCGGATAACAATTTCACACAGGATTCTTCTTCTTCTTC 3' y FAM-P3 5' TACGCATCCCAGTTTGAGACG 3'.

Los productos de amplificación de ambas PCRs se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático con el marcador de peso molecular LIZ 1200 y los electroferogramas resultantes se evaluaron con el software GeneMarker.

Determinación de variantes génicas puntuales en el gen *FXN*.

Para aquellas muestras en las cuales sólo se evidenciara expansión en un alelo se analizaría la presencia de variantes puntuales, pequeñas deleciones o inserciones, por secuenciación automática de Sanger. Para tal fin se puso a punto las reacciones de PCR necesarias para amplificar los 5 exones del gen y sus secuencias intrónicas lindantes utilizando los cebadores previamente descriptos por Pandolfo y colaboradores [15].

Estudios biofísico de variantes génicas puntuales en el gen *FXN*.

Producción de FXN recombinante: se utilizó un plásmido pET9b conteniendo la secuencia de la variante FXN90-210 (aminoácidos que forman la proteína madura) sobre el que se realizó una mutagénesis dirigida (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, NEB) para obtener las variantes puntuales deseadas (p.W155G, p.W168G y p.W173G) y posterior transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Los cebadores específicos para realizar la mutagénesis dirigida de las 3 variantes seleccionadas se diseñaron mediante el programa NEBaseChanger versión 1.2.8 (http://nebasechanger.neb.com/). Se comprobó el resultado de la mutagénesis por secuenciación de Sanger.

Para la expresión de cada una de las proteínas con las variantes se transformaron bacterias BL21 por choque térmico con el plásmido de expresión. Para cada caso, se sembraron 100 ul de bacterias en placas de LB con el antibiótico Kanamicina y se incubaron toda la noche (ON) a 37ºC. Se picó una colonia y se inoculó un cultivo líquido de 10 ml de LB con Kanamicina y se incubó ON a 37ºC con agitación. Con ese cultivo se inoculó 1 litro de medio LB con Kanamicina y se incubó a 37ºC hasta llegar a una OD600=0.8-1. Se indujo la expresión de la frataxina con lactosa monohidrogenada 1% gr/ml, incubando durante 4 horas a 37ºC. Paralelamente, como control, se realizó una purificación del plásmido y se re-secuenció. Se realizó una sonicación y centrifugación.

Posteriormente, se realizó la purificación de cada proteína. En el caso de la variante p.W155G la purificación se realizó a partir de la fracción sobrenadante (citoplasma), mientras que las variantes p.W168G y p.W173G fueron purificadas a partir de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión). En el caso de la W155G se utilizó la fracción sobrenadante directamente, y para el caso de las variantes W168G y W173G se realizó un tratamiento previo: se resuspendieron los pellets en agua y se realizó un tratamiento con lisozima y DNAsa y posterior recuperación de la proteína con diferentes concentraciones de urea. Se utilizó una columna de DEAE y soluciones de buffer Tris.HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7 con concentraciones crecientes de NaCl (0, 0.05, 0.35, 0.5 y 1M). En todos los casos se obtuvo la proteína pura en la fracción 0.35M de NaCl. Luego se realizó una diálisis para obtener la proteína en buffer 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7 y una segunda purificación en una columna de Sephadex G-100.

Las proteínas obtenidas se sometieron a un control de pureza e identidad por SDS-PAGE y HPLC/espectrometría de masa (HPLC/ESI-MS) en el Instituto LANAIS-PROEM (Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas – Conicet / UBA).

Análisis de la resistencia a la proteólisis: se incubaron 0,40 mg/ml de cada variante proteica en buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0, con quimiotripsina en una relación 1:100 masa de proteasa:masa de proteína, en un baño de agua a 25°C. La reacción fue interrumpida a diferentes tiempos mediante la adición de PMSF concentración final 1 mM. Como control, a tiempo 0 se tomaron 50 µl de cada

muestra, se le agregó 0,5 µl de PMSF y se conservó a -20°C y se incubaron 50 µl de cada muestra sin proteasa durante el tiempo total del experimento. Finalmente, se incubaron 300 µl de cada proteína con quimiotripsina y se procedió a tomar alícuotas de 50 µl a los 20 min, 40 min, 60 min y 120 min interrumpiendo en cada caso la reacción mediante la adición de PMSF y congelando a -20°C hasta su análisis. Este experimento se realizó por duplicado para todas las variantes.

Se analizaron los resultados sembrando alrededor de 2,5-3 µg de cada proteína en geles desnaturalizantes SDS-PAGE 16%.

Análisis biofísico de las variantes: por un lado, se estudió la fluorescencia resultante del proceso de desplegado inducido por diferentes concentraciones de urea. Se incubó a temperatura ambiente aproximadamente 4 µM de cada proteína con diferentes concentraciones de urea (0M a 7M con un Δcc de 0,2 µM) en solución buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7 por 2-3 hs. El espectro de fluorescencia fue adquirido a 20°C. Se realizó la excitación de la muestra a 295 nm y se midió la emisión entre 307-470nm. Se adquirieron 2 espectros, los cuales fueron promediados y corregidos por sustracción del valor correspondiente al blanco.

Por otro lado, se estudió la desnaturalización de las variantes inducida por temperatura mediante el cambio de intensidad en la señal de la sonda fluorescente Sypro Orange. Se utilizó 5 µM de proteína en un buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7 y la sonda a una concentración 2x. La muestra fue calentada de 20 a 98 °C (1°C/minuto), la excitación se realizó a 470-500 nm y la emisión se detectó a 540-700nm. Se realizó cada medición por triplicado.

Análisis *in vitro* de la actividad: para determinar la actividad de la proteína con las variantes, se midió la catálisis de Cisteína a Alanina por el complejo NFS1/ACP-ISD11/ISCU/FXN mediante la producción de sulfuro de hidrógeno siguiendo el protocolo descripto en [16] en la cual la cuantificación de sulfuro se realiza por una reacción colorimétrica en la cual se genera azul de metileno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 96% de los pacientes con FRDA poseen una expansión de un triplete GAA en el gen *FXN* en forma homocigota. Aproximadamente el 4% restante, posee un alelo con una expansión y el otro alelo con una variante puntual patogénica. Por lo tanto, el diagnóstico molecular se basa en detectar los alelos con la expansión del triplete y, en caso de encontrarse un paciente heterocigota para la amplificación, la búsqueda de una alteración puntual en la secuencia del otro alelo. Fue por ello, que se puso a punto una PCR fluorescente y una TP-PCR para detectar los alelos expandidos y la secuenciación Sanger de todos los exones de la FXN.

Durante la etapa de puesta a punto, uno de los familiares que consintió participar en el proyecto, resultó tener amplificación homocigota. Esto fue un hallazgo, ya que era el padre (de 58 años) de un paciente con diagnóstico confirmado. El individuo no presentaba síntomas, por lo tanto se esperaba que fuera sólo portador de un alelo con la expansión acorde al carácter recesivo de la patología. A los efectos de confirmar el hallazgo, el estudio se realizó por duplicado. El resultado molecular de este padre fue la presencia de expansión en ambos alelos, pero una de esas expansiones poseía 83 tripletes, por lo que se trató de un caso de inicio tardío (Late onset Friedreich ataxia). Se contactó al médico

interviniente para realizar la devolución de este resultado y éste, ahora paciente, pudo ser asesorado y a partir de ese momento realizar los controles médicos pertinentes.

Luego de la puesta a punto, se incluyeron 18 pacientes derivados con sospecha clínica de la patología para el diagnóstico molecular: 15 fueron derivados por un médico genetista y 3 por un médico neurólogo. En 5 pacientes se detectó una expansión homocigota, pudiéndose confirmar el diagnóstico. Estos pacientes presentaban entre 12 y 32 años al momento del diagnóstico, y entre las características más frecuentes: 3 presentaban miocardiopatía hipertrófica, 4 presentaban disartria, 4 presentaban escoliosis, 3 sensibilidad de posición y vibratoria. Ninguno presentó hipertrofia de miembros inferiores, diabetes o intolerancia a la glucosas, atrofia óptica ni anomalías en el movimiento ocular, tampoco trastornos deglutorios y ninguno usaba todavía silla de ruedas. El resto de los pacientes estudiados no presentaron alelos con expansión.

A pesar de haber realizado difusión de la disponibilidad del estudio molecular por diferentes vías, y de contar con el apoyo de ATAR (Asociación Civil de Ataxias de Argentina), la cantidad de pacientes derivados para la realización del estudio molecular fue baja. Por lo tanto, teniendo en cuenta que aproximadamente un 4% de los pacientes poseen un alelo con expansión y otro con una alteración puntual, no resulta sorprendente que ninguno de los pacientes analizados posea una expansión en uno solo de sus alelos.

En la Figura 1A se observa el resultado de una PCR fluorescente de un paciente con dos alelos sin expansión de tripletes en *FXN*. En la figura 1B se observa el resultado de una TP-PCR de un paciente con un patrón de picos que se corresponde con la presencia de alelos expandidos.

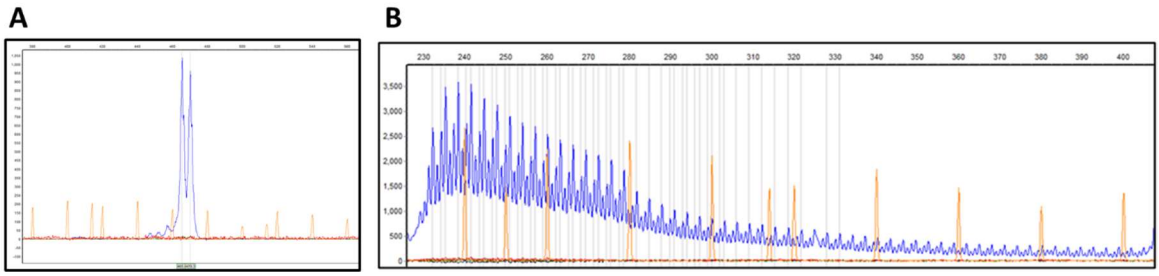


Figura 1. Resultado de A) una PCR fluorescente para la región repetitiva de FXN, B) una TP-PCR de un paciente homocigota para la expansión en *FXN*.

La segunda parte del proyecto incluyó el estudio de variantes puntuales en la proteína frataxina con el objetivo de determinar su patogenicidad y contribuir a comprender más la etiopatogenia de la enfermedad. Para tal fin se seleccionó una variante descripta en pocos pacientes de la literatura, p.W173G (NP_000135.2), y dos variantes que representan el mismo cambio aminoacídico pero en posiciones diferentes para comparar sus efectos: p.W155G y p.W168G. La variante W173G fue descripta por primera vez por Cossé y colaboradores [12] quienes la observaron en afectados de dos familias de origen estadounidense e italiano. Luego, fue reportada nuevamente por Gellera y colaboradores [14] quienes encontraron también esta variante en 3 familias de afectados. Esta variante se encuentra descripta en ClinVar (RCV000004191) como probablemente patogénica.

Mediante la metodología utilizada se obtuvieron las tres variantes de proteína frataxina en su forma madura. Las proteínas purificadas fueron analizadas por espectrometría de masa (ESI-MS), obteniéndose masas compatibles con la masa molecular esperada para

cada variante. Mediante cromatografía se corroboró que todas estaban correctamente plegadas, en estado monomérico y con su estructura terciaria conservada.

Con el fin de obtener información sobre la estabilidad de las variantes se realizó un experimento de sensibilidad a la proteólisis mediante quimiotripsina. La resistencia a la proteólisis es una característica de las proteínas que se relaciona con su estabilidad, rigidez y secuencia aminoacídica. La proteasa quimotripsina es capaz generar cortes sobre residuos aromáticos (Trp, Phe y Tyr) accesibles a la proteasa, aportando información sobre la exposición de dichos residuos. Entre 20 y 25 °C, la FXN silvestre es resistente a la proteólisis.

La variante silvestre resultó extremadamente resistente a la proteólisis, como se ha observado previamente en el laboratorio. De igual manera, la variante W155G también resultó resistente al tratamiento con quimiotripsina. Luego de 20 minutos de incubación, la variante W173G se encontró digerida prácticamente en su totalidad y luego de 40 minutos tanto la W168G como la W173G se encontraron completamente digeridas (Figura 2).

En términos de la estructura terciaria de la FXN, el Trp155 se encuentra en la superficie de la proteína, el Trp168 se encuentra parcialmente expuesto al solvente y el Trp173 es parte del *core* de la proteina. Sin embargo, a pesar de encontrarse más expuesta, la variante W155G resultó ser resistente a la degradación por la proteasa quimiotripsina mientras que las variantes W168G y W173G resultaron muy sensibles.

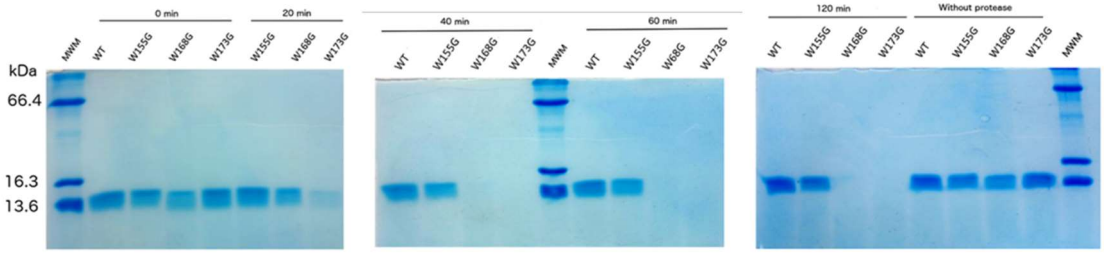


Figura 2. Resultado de la proteólisis con quimiotripsina de las diferentes variantes y la proteína salvaje.

Para estudiar la estabilidad conformacional de las variantes realizamos experimentos de análisis del cambio en la intensidad de fluorescencia emitida por los triptofanos durante la inducción del desplegado mediante concentraciones crecientes de urea. Los cambios W168G y W173G resultaron altamente desestabilizantes para la FXN. Por el contrario, la estabilidad de la variante W155G fue sólo levemente menor a la de la variante salvaje. (Figura 3).

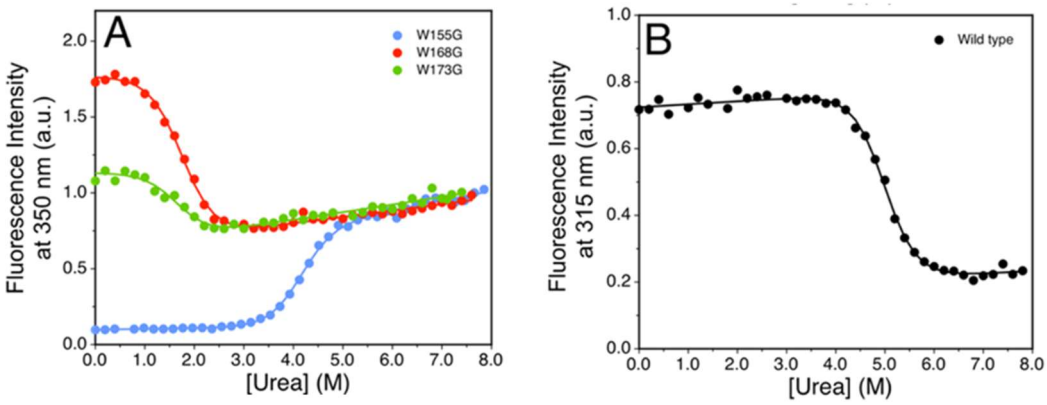


Figura 3. Desplegado inducido por urea de A) las tres variantes de FXN medida a 350 nm y B) proteína salvaje, medido a 315 nm.

Por otro lado, se estudió la desnaturalización de las variantes inducida por temperatura mediante el cambio de intensidad en la señal de la sonda fluorescente Sypro Orange. Esta sonda interactúa con el estado desplegado de la proteína permitiendo visualizar su proceso de desplegado. La señal se encuentra quencheada en el ambiente acuoso, pero emite fluorescencia cuando la sonda se une a los residuos apolares a medida que la proteína se va desplegando. La tendencia observada para las variantes según los valores de la temperatura de melting (Tm) fue: variante salvaje> W155G > W168G > W173G. Asimismo, los perfiles de desplegado inducido por temperatura que se observaron para las variantes W168G y W173G mostraron una unión sustancial de la sonda fluorescente a temperaturas bajas (mayor unión en el caso de la variante W173G) (Figura 4). Esto sugeriría que el core de estas variantes podría estar, al menos en parte, distorsionado y parcialmente expuesto al solvente.

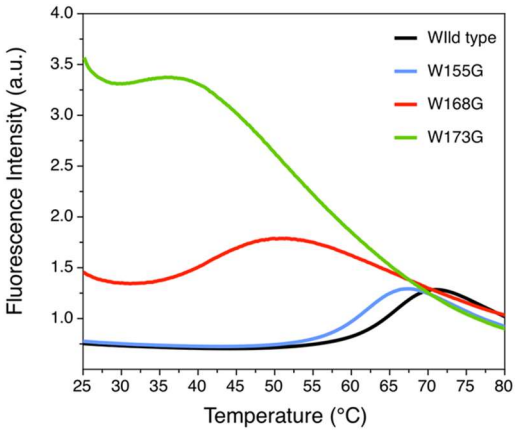


Figura 4. Desplegado de las diferentes variantes inducido por temperatura.

Para evaluar la actividad biológica de cada variante de FXN se estudió la capacidad de las mismas para activar la enzima cisteína desulfurasa (NSF1) por medio de la técnica de azul de metileno. La variante W155G presentó una muy baja capacidad de activación de la desulfurasa. Este resultado se condice con lo que era esperable, ya que este residuo (Trp 155) en la FXN es una de las cadenas laterales clave en la arquitectura del sitio de ensamblaje de los clusters Fe-S. Por su lado, la variante W173G también mostró una muy baja activación, tan sólo un poco mayor que la W155G. La variante W168G mostró una activación similar que la variante salvaje, por lo que esta variante no influiría en la actividad biológica de la proteína (Figura 5).

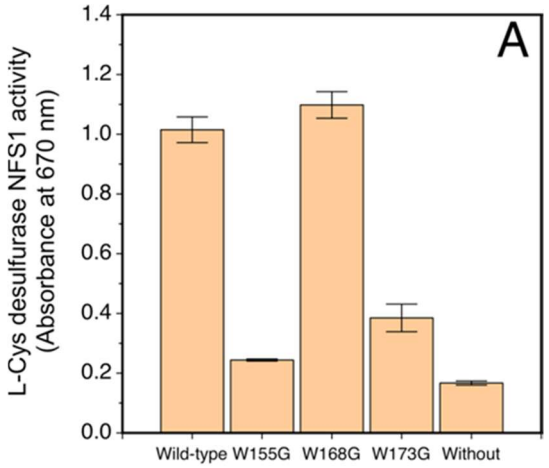


Figura 5. Capacidad de activación de la NFS1 de la FXN salvaje, las tres variantes y del complejo sin frataxina (control).

CONCLUSIONES

La puesta a punto de una técnica molecular para el diagnóstico de pacientes con Ataxia de Friedreich en una institución de salud pública resulta de extrema importancia ya que permite dar acceso a prestaciones de calidad. Si bien la demanda del mismo no fue la proyectada, el haber podido incorporar la metodología a nuestro laboratorio, expande la posibilidad de que más personas puedan acceder al diagnóstico en un futuro. Aquellos que pudieron beneficiarse del mismo, tuvieron la oportunidad de ser asesorados por su médico genetista o neurólogo y en base a los resultados poder realizar un mejor seguimiento de su cuadro clínico y asesoramiento genético familiar.

En relación a los estudios de las variantes de FXN, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, la variante W155G no produciría una desestabilización de la proteína sino una desventaja funcional respecto a la variante salvaje. La variante W168G no influiría en la funcionalidad de la proteína pero le infiere una desestabilización conformacional y sería sensible a la proteólisis. La variante W173G resultó ser sensible a la proteólisis, inestable conformacionalmente y con efectos negativos en la función de la FXN.

Nota: Parte de los resultados del presente proyecto fueron incluidos en la publicación: Conformational stability, dynamics and function of human frataxin: Tryptophan side chain interplay. Lucía D Espeche, Karl Ellioth Sewell, Ignacio H Castro, Luciana Capece, María Florencia Pignataro, Liliana Dain, Javier Santos. Arch Biochem Biophys. 2022 Jan 15;715:109086. doi: 10.1016/j.abb.2021.109086.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paulson H, Arbor A (2006) Repeat Expansion Diseases.
2. Skre H (1975) Friedreich's ataxia in Western Norway. Clin Genet 7:287–298. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1975.tb00331.x.
3. Winter RM, Harding AE, Baraitser M, Bravery MB (2008) Intrafamilial correlation in Friedreich's ataxia. Clin Genet 20:419–427. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1981.tb01052.x.

4. Leone M, Brignolio F, Rosso MG, et al (1990) Friedreich's ataxia: a descriptive epidemiological study in an Italian population. Clin Genet 38:161–169. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1990.tb03566.x.

5. Cossee M, Schmitt M, Campuzano V, et al (1997) Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. Proc Natl Acad Sci 94:7452–7457. https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7452.

6. Epplen C, Epplen JT, Frank G, et al (1997) Differential stability of the (GAA)(n) tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. Hum Genet 99:834–836. https://doi.org/10.1007/s004390050458.

7. Dürr A, Cossee M, Agid Y, et al (1996) Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia. N Engl J Med 335:1169–1175. https://doi.org/10.1056/NEJM199610173351601.

8. Delatycki MB, Corben LA (2012) Clinical Features of Friedreich Ataxia. J Child Neurol 27:1133–1137. https://doi.org/10.1177/0883073812448230.

9. Pandolfo M (2009) Friedreich ataxia: The clinical picture. J Neurol 256:3–8. https://doi.org/10.1007/s00415-009-1002-3.

10. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, et al (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 271:1423–7. https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423.

11. Pandolfo M (2001) Molecular basis of Friedreich ataxia. Mov Disord 16:815–21. https://doi.org/10.1002/mds.1162.

12. Cossée M, Dürr A, Schmitt M, et al (1999) Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. Ann Neurol 45:200–206. https://doi.org/10.1002/1531-8249(199902)45:2<200::AID-ANA10>3.0.CO;2-U.

13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16:1215. https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215.

14. Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, et al (2007) Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. 289–299. https://doi.org/10.1007/s10048-007-0101-5.

15. Pandolfo M (2006) Friedreich Ataxia: Detection of GAA Repeat Expansions and Frataxin Point Mutations. In: Congenital Heart Disease. Humana Press, New Jersey, pp 197–216.

16. Castro IH, Bringas M, Doni D, et al (2020) Relationship between activity and stability: Design and characterization of stable variants of human frataxin. Arch Biochem Biophys 691:108491. https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108491.

ABSTRACT

Friedreich ataxia (FRDA) is an early onset autosomal recessive disease characterized by spinocerebellar degeneration and cardiomyopathy. It is caused by frataxin (FNX) deficiency, a nuclear-encoded protein localized in mitochondria. 96 % of patients are homozygous for the expansion of a GAA repeat in the first intron of the frataxin gene, whereas 4% of them are compound heterozygous for a GAA expansion and a frataxin

point mutation. Few laboratories in our country perform molecular diagnosis of this pathology. Here, we aimed at implementing molecular testing for FRDA in a public health institution to study our population and provide better genetic counseling to the patients and their families. Also, we studied one FXN variant described previously in patients (p.W73G) and the same amino acid change in the two other tryptophans (p.W155G and p.W168G). The goal was to better understand their impact on stability and protein function and the possible impact on phenotype.

A fluorescent PCR and a TP-PCR were designed. 18 patients were analyzed with these methodologies, 5 of which were homozygous for an expansion. All of the rest presented alleles with repeats within the “normal” range.

The 3 FXN variants were expressed in bacteria, purified and assessed for stability, proteolysis resistance and functionality. We performed chymotrypsin proteolysis resistance, urea and thermal-induced unfolding and NFS1 activation experiments. The W155G variant resulted with great stability but was not able to activate the desulfurase activity of the supercomplex for iron–sulfur cluster assembly. W168G, which was significantly more unstable than W155G and highly sensitive to proteolysis, was fully active. W173G, which was highly unstable and sensitive to proteolysis as W168G, showed a significantly decreased activity, only slightly higher than W155G.

ROL DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE ADN EN LA PATOGÉNESIS DE LA SINOVITIS CRÓNICA EN PACIENTES CON HEMOFILIA TRATADOS CON PRP

Julia Etulain

Laboratorio Trombosis Experimental. Instituto de Medicina Experimental. CONICET - Academia Nacional de Medicina

RESUMEN

La hemofilia es una coagulopatía causada por el déficit de factores de la coagulación. El 80% de las hemorragias son espontáneas, ocurren en las articulaciones y constituyen la mayor causa de morbilidad en hemofilia ya que conducen al desarrollo de la sinovitis crónica hemofílica (SCH) en la infancia-adolescencia que degenera a la artropatía o daño irreversible y discapacidad en el adulto. El único tratamiento disponible para estas complicaciones es la profilaxis del sangrado. Ésta es costosa (debido a la administración crónica de factores recombinantes) y únicamente se enfoca en frenar la coagulopatía y no la degeneración articular. Aquí se propuso estudiar sobre la inyección intra-articular de plasma rico en plaquetas (PRP); un método alternativo, simple y factible que podría simultáneamente prevenir la hemartrosis y regenerar el cartílago articular. El primer estudio piloto sobre esta aplicación en SCH fue publicado en el año 2017 por el grupo argentino liderado por el Dr Caviglia (jefe del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Fernández, CABA). Allí demostraron que el tratamiento con PRP mejora el score de salud articular, y disminuye el sangrado y dolor articular. En el marco de este proyecto se estudiaron las bases biológicas subyacentes a la acción de PRP en SCH. Utilizando muestras de líquido sinovial y sangre periférica de los pacientes enrolados en un ensayo clínico dirigido por el Dr Caviglia se estudió la participación de un proceso de activación de los neutrófilos denominado trampas extracelulares de ADN (NETs) en la patogenia de la SCH.

La hipótesis de este trabajo plantea que la acción terapéutica del PRP se debe a la inhibición de estas estructuras y a la posterior regeneración del cartílago articular. Dicha hipótesis fue abordada a través de objetivos específicos que involucró el procesamiento de muestras de líquido sinovial obtenido de rodillas de 19 pacientes. Los niveles de NETs sinoviales y plasmáticos fueron determinados a través de la cuantificación de ADN (fluorometría) y la observación y cuantificación de los complejos ADN-Elastasa por microscopía de fluorescencia y ELISA, respectivamente. La asociación entre las NETs y los parámetros clínicos fue evaluada con el empleo de un software digital a través de las correlaciones de Pearson o Spearman.

En conjunto los resultados de este trabajo demostraron que: 1) Distintos estadios en la formación de NETs están presentes en el líquido sinovial de pacientes con SCH; 2) Los niveles de ADN y ADN-Elastasa sinoviales correlacionan positivamente con el score de daño articular; 3) El líquido sinovial de pacientes con SCH contiene factores pro-NETóticos activos que inducen liberación de NETs en neutrófilos aislados de sangre periférica y ese proceso se inhibe en presencia de plasma; y 4) Los niveles de ADN y ADN-Elastasa plasmáticos y sinoviales correlacionan entre sí sugiriendo que los mismos podrían ser biomarcadores de evolución en SCH.

En conjunto, los resultados de este trabajo permitirían postular a las NETs como posibles biomarcadores pronósticos y blancos terapéuticos de la SCH y a sentar las bases biológicas para el uso de PRP en SCH.

INTRODUCCIÓN

Hemofilia.

La hemofilia es una coagulopatía hereditaria ligada al sexo, la cual se caracteriza por el déficit de factores de coagulación. En función de esto se clasifican en distintos tipos de Hemofilia. La ausencia de factor VIII de la coagulación produce hemofilia de tipo A (afecta 1:5.000-10.000 varones nacidos vivos) y la ausencia de factor IX produce Hemofilia tipo B (afecta 1:25.000-30.000 varones nacidos vivos)[1]. En el caso de la hemofilia C hay un déficit en el factor XI en la coagulación y no está ligado al cromosoma X. Como consecuencia, la cascada de coagulación gatillada por la vía intrínseca (esquematizada en la Figura 1) no se gatilla y ocurren hemorragias.

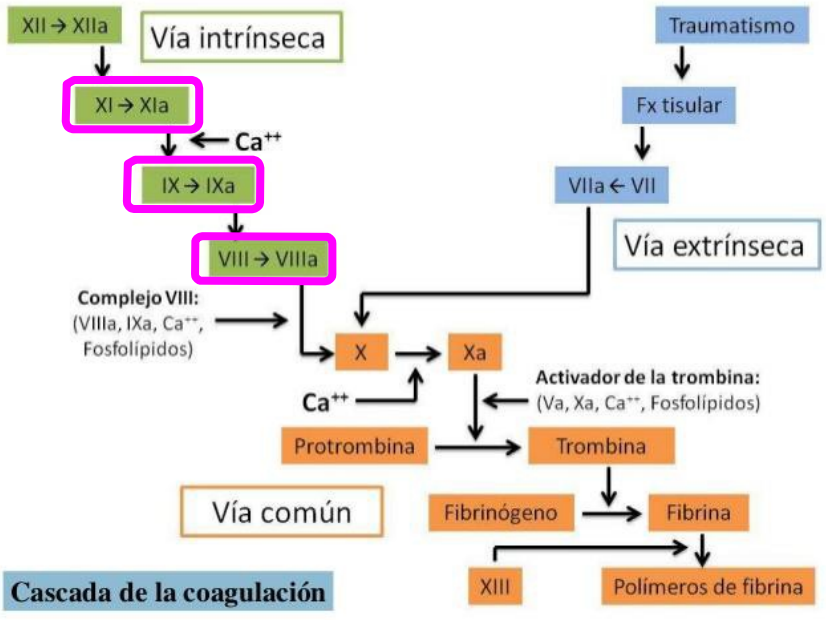


Figura 1. Esquema de la cascada de coagulación. Obtenido de[2].

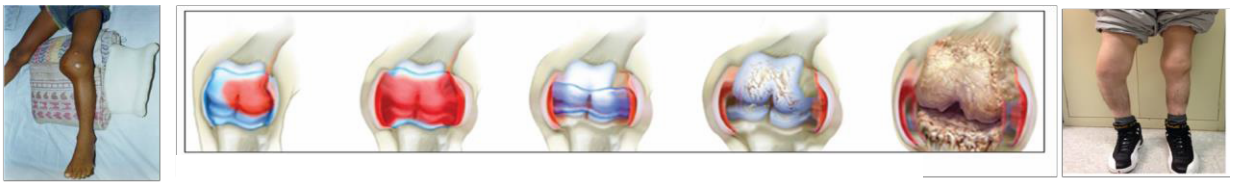
Como toda enfermedad ligada al sexo, las generalidades indican que la mujer es portadora y el varón manifiesta los síntomas. Esto está fundamentado en que el par de cromosomas 23 posee los genes que expresarán los factores necesarios para la

coagulación. La mujer dispone de dos alelos de los cromosomas "XX", estos guardan la información genética para dichos factores. En caso de que uno se encuentre dañado y el otro sano, este último será el dominante, por lo que el primero actuará como alelo recesivo. Así pues, la mujer es más propensa a ser portadora. Solo en caso de que ambos alelos se encuentren dañados, la mujer manifestará los síntomas de la hemofilia. En el caso del varón, el par de cromosomas 23 es "XY". De esta forma, solo poseerá un solo alelo (el derivado del cromosoma "X") con la información imprescindible para expresar los factores de coagulación. De tener este alelo dañado, no habrá ningún alelo dominante que pueda compensar el daño. En consecuencia, se presenta un porcentaje mayor de varones manifestantes de dicha patología, que mujeres. Si bien la mayor causa de mortalidad en hemofilia es causada por hemorragias cerebrales que ocurren de manera espontánea, la mayor causa de morbilidad son las complicaciones en el sistema músculo-esquelético[3-6].

Sinovitis crónica hemofílica.

El 80% de hemorragias en hemofilia ocurre de manera espontánea en el sistema músculo- esquelético y conduce a la degeneración progresiva y crónica de la articulación (Figura 2). La sinovitis (inflamación de la membrana sinovial) se origina desde la infancia (cuando los niños comienzan a gatear) debido al ingreso de sangre en las articulaciones. La sinovitis crónica hemofílica (SCH) se desarrolla a partir del tercer sangrado y luego de varios años progresa en el deterioro de la articulación de manera irreversible, también denominado artropatía hemofílica (AH). Estas complicaciones son la mayor causa de morbilidad en hemofilia. Si bien los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el desarrollo de estas complicaciones no han sido completamente esclarecidos, se sabe que la presencia de hierro libre en la articulación es tóxica. Para entender este proceso es importante explicar la fisiología de la articulación. La parte central de la articulación está compuesta por huesos y una cavidad sinovial. El extremo de los huesos se encuentra recubierto por el cartílago cuya unidad celular son los condrocitos, responsables de producir el líquido sinovial. Este fluido viscoso amortigua la fricción entre los huesos, permitiendo la movilidad de los mismos y reduciendo su desgaste. Por último, se encuentra la membrana sinovial, cuya función es mantener encapsulada a la solución viscosa producida por los condrocitos.

Al ingresar la sangre en las articulaciones, ésta queda retenida y posteriormente ocurre la eritrolisis que ocasiona la liberación del hierro acoplado a la hemoglobina empaquetada en los glóbulos rojos (GR). El hierro extracelular cambia de valencia a su estado oxidado desencadenando una serie de procesos moleculares y celulares. Entre ellos se destacan 1) la angiogénesis o vascularización aberrante de la membrana sinovial, volviéndose ésta más vulnerable al sangrado y progresando a una hipertrofia sinovial; 2) la muerte de condrocitos desencadena la destrucción del cartílago y la disminución del líquido sinovial producido por estas células y; 3) la activación de células del sistema inmune constitutivas del líquido sinovial que liberan sustancias pro-inflamatorias (citoquinas y quimioquinas) responsables del reclutamiento y activación de otras células inmunes circulantes. De esta forma, se crea un círculo vicioso de respuesta inmune exacerbada adentro de la articulación[1,4,7].



Sinovitis (infancia) **-> Sinovitis crónica** (11-48 años) **->Artropatía fase 1 -> Artropatía irreversible**

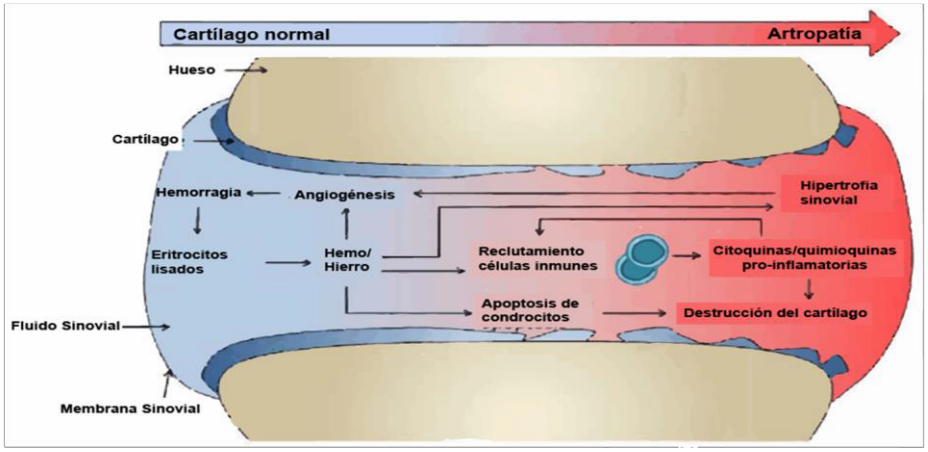


Figura 2. Esquema de estructura de una rodilla durante el proceso de cartílago normal a artropatía, causado por la SCH. Adaptado de Peyron *et al*[7].

Dentro de las células del sistema inmune involucradas en la SCH se ha descripto a los monocitos como principales responsables de este proceso. Si bien los neutrófilos constituyen el mayor porcentaje de glóbulos blancos sanguíneos y, por ende, los que ingresan en mayor porcentaje a la articulación durante los sangrados, es llamativo que el rol de estas células en la SCH aún no haya sido estudiado.

Trampas extracelulares de ADN (NETs).

La principal función de los neutrófilos es eliminar patógenos para prevenir posibles infecciones. Estas células poseen dos mecanismos de eliminación de microorganismos. Por un lado, se encuentra la fagocitosis de elementos formes. Una vez dentro, los gránulos de este tipo de leucocito, se encargan de degradar las membranas de las células ajenas al organismo, liberando sustancias lipídicas. Por otro lado, en el año 2004 se descubrió la propiedad de los neutrófilos de generar trampas extracelulares de DNA (NETs). Estas últimas se originan en el interior de la célula al ser activada por la presencia de un organismo ajeno como estímulo. En principio, el núcleo se disuelve quedando la cromatina expuesta al citoplasma donde también están situados los gránulos, que se adherirán al ADN formando una red (Figura 3). Así pues, se expulsará al medio extracelular lográndose un resultado bastante más abarcativo, ya que atrapa una mayor cantidad de cuerpos extraños a diferencia del anterior mecanismo.

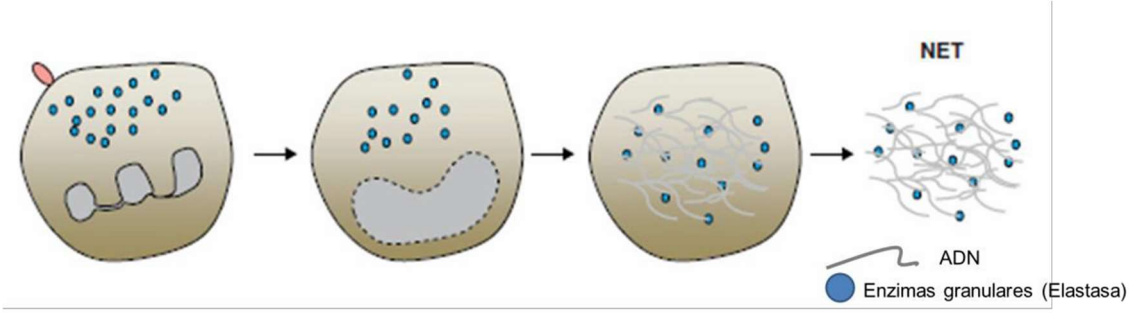


Figura 3. Esquema de la formación de NETs. Frente a un estímulo, se pierde la membrana nuclear, el ADN se descondensa y se fusiona con proteínas de los gránulos (ej: Elastasa) y se libera al medio extracelular.

A pesar del beneficioso efecto microbicida de las NETs, la persistencia de estas estructuras (debido a la formación exacerbada o a la alteración de mecanismos involucrados en su degradación) también induce daño tisular y se asocia a un peor pronóstico en injuria pulmonar aguda, disfunción renal y úlcera de pie diabético[8-12]. En el contexto de las artropatías, las NETs fueron halladas en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea y artritis séptica, correlacionando positivamente con un mayor daño articular[13,14]. Estudios más recientes sugieren que las NETs también podrían estar presentes en el líquido sinovial de pacientes con SCH ya que por un lado se demostró que el hemo/hierro recluta y activa neutrófilos, inhibe la apoptosis e induce formación de NETs[15-18]; y por el otro, es ampliamente sabido que las altas concentraciones de moléculas inflamatorias presentes en el líquido sinovial[19] son inductoras de NETs[8,20]. En conjunto, la hipótesis de este trabajo plantea que los neutrófilos son reclutados a la cavidad sinovial de pacientes con SCH, forman NETs de manera localizada e inducen daño articular.

La homeostasis citotóxico/microbicida de las NETs parecería ser controlada por la acción del plasma. El plasma es la fracción líquida y acelular de la sangre compuesta por agua, proteínas, sales, enzimas, glucosa, entre otros. Entre las enzimas presentes se encuentran moléculas plasmáticas (incluyendo proteína C reactiva, PTX3, proteína C activada, lactoferrina, proteínas inhibitorias inter-α y factor H) que por un lado interfieren con la formación de NETs, y por el otro ejercen un efecto citoprotector en las células susceptibles al daño impidiendo, entre otros procesos, la acción citotóxica de histonas y enzimas granulares expuestas en el medio extracelular[21-27]. Además, el plasma contiene ADNasas que degradan a las NETs. Estudios recientes han descripto que la alteración o la disminución de la función NETolítica de estas ADNasas es la causante del daño tisular observado en el contexto de injuria intestinal, nefritis asociada a lupus, síndrome urémico hemolítico y periodontitis[11,12,28-31]. Aplicado al contexto de la SCH, estas evidencias permiten inferir que el agregado de plasma fresco en la cavidad sinovial ejercería un efecto citoprotector ante el daño articular causado por las NETs sinoviales.

PLAQUETAS

Generalidades de las plaquetas.

Las plaquetas son fragmentos que derivan del megacariocito en un proceso llamado trombopoyesis que ocurre en la médula ósea. Las plaqueta circulan en el torrente sanguíneo, su vida media es de 7 a 10 días y su tamaño es de 1 a 3 μm[32]. Las plaquetas no poseen núcleo pero tienen gránulos que contienen proteínas (gránulos alfa) y otros gránulos que contienen sustancias inorgánicas como Ca^{+2}, ADP y ATP (gránulos densos). A su vez, las plaquetas contienen mitocondrias, citoplasma y una membrana externa que forma un sistema canalicular abierto y un sistema tubular denso, ambos son invaginaciones de la membrana plasmática que están involucrados en la secreción de los gránulos mencionados anteriormente. El sistema canalicular abierto segrega los gránulos alfa y el sistema tubular denso, los gránulos densos. Estas estructuras se encuentran señalizadas en la Figura 4[32].

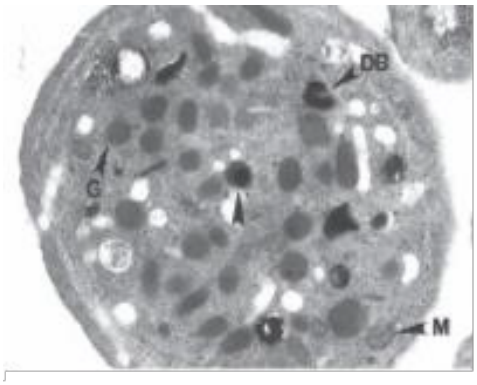


Figura 4. Micrografía electrónica de una plaqueta conteniendo gránulos alfa (G), mitocondrias (M) y gránulos densos (DB). Magnificación 25000X. Adaptado de Michelson, 2013[32].

Papel de las plaquetas en la hemostasia.

Las plaquetas son los principales actores en la hemostasia, que es el conjunto de mecanismos para detener los procesos de hemorragia, que incluyen la activación plaquetaria y la coagulación[33]. Estos mecanismos son procesos secuenciales y solapados que se encuentran esquematizados en la Figura 5. Este proceso comienza con la ruptura del endotelio vascular, exponiendo al torrente sanguíneo a sustancias del subendotelio incluyendo Factor von Willebrand (FvW) y colágeno. Las plaquetas circulantes interaccionan con ambas moléculas a través de receptores de membrana activando así la adhesión plaquetaria. Esta interacción gatilla por un lado la liberación de los gránulos densos que contienen moléculas de ADP, entre otras; y por el otro, induce la generación de Tromboxano A2 (TXA2). Ambas moléculas actúan de manera autócrina amplificando la activación plaquetaria, y parácrina induciendo la activación de otras plaquetas circulantes. Por otro lado, durante la adhesión al subendotelio es activada la glicoproteína (GP) IIb/IIIa de la superficie plaquetaria. En su conformación activa, la GPIIb/IIIa se une al fibrinógeno plasmático, funcionando como un puente entre plaquetas, proceso que se denomina agregación plaquetaria[33]. Solapadamente, en la superficie de plaquetas activadas se desencadena la cascada de coagulación que culmina con la generación de trombina. Esta enzima polimeriza al fibrinógeno en fibrina, proceso denominado coagulación. La trombina, además de ser el último factor de la cascada de coagulación, también es el activador plaquetario más potente, desencadenando la activación irreversible de estas células que culmina con la liberación del contenido de los gránulos alfa[33].

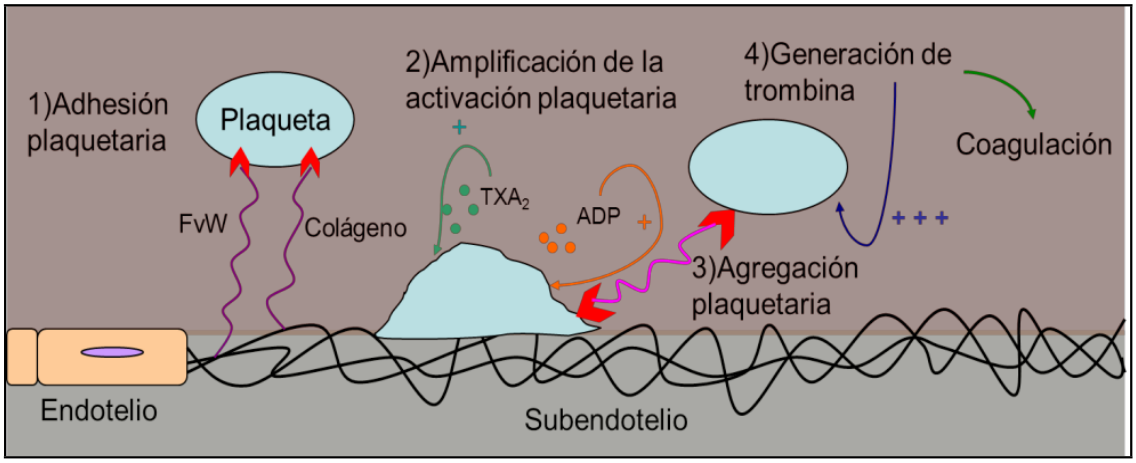


Figura 5. Esquema del proceso general de hemostasia en el que se observan sus distintas etapas, en las que se activan las plaquetas gracias a la acción de determinadas sustancias liberadas por los gránulos plaquetarios, agregándose y formando un coágulo primario que posteriormente, y gracias a la acción de otras sustancias del mismo medio, derivará en el producto final que es el coágulo secundario. Adaptado de Jurk, 2010[33].

Además de su rol clave en la hemostasia y en trombosis, las plaquetas participan en otros procesos fisiológicos tales como inflamación y la angiogénesis. Estos procesos se deben a que las plaquetas liberan desde sus gránulos alfa quemoquinas, moléculas inmunológicas y factores moduladores de la angiogénesis (Tabla 1).

Tabla 1. Principales componentes de los gránulos alfa plaquetarios.[34]

Moléculas de adhesión: P-selectina, factor von Willebrand, trombospodina, fibrinógeno, integrina αIIbβ3, integrina αvβ3, fibronectina, CD40L, CD63.
Quemoquinas: Proteínas plaquetarias básicas (factor plaquetario 4 y sus variantes (CXCL4) y β-tromboglobulina), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL17 (regulador de crecimiento oncogénico α), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), factor de crecimiento del estroma.
Factores de la coagulación: Factor V, multimerina, factor V y VIII.
Fibrinolisis: α2-Macroglobulina, plasminógeno, inhibidor 1 del activador de plasminógeno.
Crecimiento y angiogénesis: Factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento hepatocítico, factor de crecimiento insulínico tipo 1, factor de crecimiento transformante β, factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Angiostatina y endostatina (inhibidores de la angiogénesis).
Moléculas inmunológicas: Globulina β1H, factor D, inhibidor c1, IgG.
Otras proteínas: Albúmina, α1-antitripsina, Gas6, glicoproteína rica en histidina, kinógeno de alto peso molecular, proteasa osteonectina nexin-II (precursor de β-amiloide)

Papel de las plaquetas en la angiogénesis y la regeneración tisular.

A través de la liberación de distintos factores de crecimiento provenientes de los gránulos alfa, las plaquetas son capaces de modular la angiogénesis. El proceso de angiogénesis consiste en la fabricación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes. Esto ocurre comúnmente durante las etapas de desarrollo embrionario, de crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas, así como es fundamental en ciertos procesos patológicos como es el crecimiento tumoral[35]. La ocurrencia de estos fenómenos angiogénicos junto con la regulación orquestada del sistema inmune y hemostático son fundamentales durante el complejo proceso de cicatrización de heridas y regeneración tisular[36]. Estos procesos comprenden tres etapas: 1) etapa inflamatoria, 2) etapa proliferativa, 3) etapa de remodelación o maduración (Figura 6).

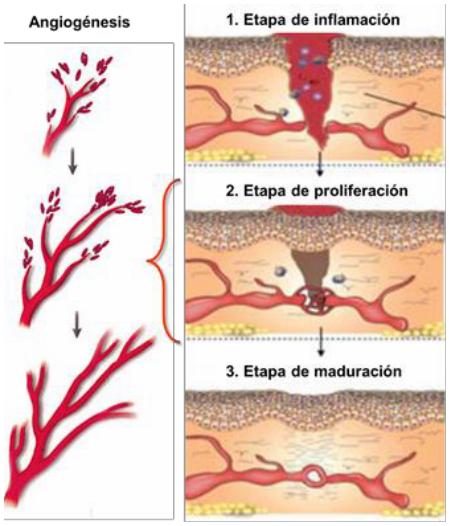


Figura 6. Esquema de las etapas de cicatrización de heridas y reparación de tejidos. Adaptado de Shin-Chen, 2013[37].

Debido a su efecto anti-hemorrágico y pro-angiogénico, los derivados de PRP, también denominados biomateriales plaquetarios, son actualmente empleados en diversas situaciones clínicas. Estos materiales se utilizan en el ámbito hospitalario, así como en centros de cirugía ambulatoria y consultorios médicos privados u odontológicos. La primera aplicación documentada de estos biomateriales fue realizada durante una cirugía cardíaca en 1987[38] y en la actualidad el uso de PRP en la medicina regenerativa ha crecido significativamente ya que los mismos son empleados en el tratamiento de diversas situaciones clínicas incluyendo curación de las úlceras recalcitrantes y quemaduras, estimulación de la regeneración de tejido óseo en odontología, implantología y cirugía maxilofacial y plástica, como así también en la osteoartritis de rodilla y en la reparación de lesiones de los tejidos músculo-esqueléticos en medicina deportiva (Figura 7)[39].



Figura 7. Ejemplos de aplicaciones del PRP en la medicina regenerativa.

Las ventajas de la administración de PRP están asociadas a su método de obtención económico, rápido y simple, como así también a la ausencia de efectos adversos debido a su origen autólogo (proviene del mismo individuo al cual se lo aplica), evitando necrosis tisular o respuestas inmunológicas por parte del huésped. No obstante, en pacientes con bajo recuento plaquetario o enfermedades asociadas a anomalías de estas células los tratamientos pueden ser realizados con donaciones alogénicas (es decir que el dador y el receptor son distintas personas)[40]. Teniendo en cuenta la creciente aplicación clínica del PRP, en la actualidad es necesario optimizar no sólo los métodos de obtención de estos biomateriales, sino también entender y profundizar las bases biológicas que subyacen a dichos tratamientos clínicos[41].

Inyección intra-articular de PRP en sinovitis crónica hemofílica.

El frenado de los sangrados articulares junto con la regeneración del cartílago articular son los dos grandes desafíos no resueltos de la SCH. Los tratamientos médicos actuales buscan reducir las hemorragias a través de la profilaxis por administración endovenosa de los factores de coagulación carentes, y la radiosinovectomía o remoción de la membrana sinovial hipertrófica[42]. Estos tratamientos no contemplan la disminución de la inflamación ni la regeneración del cartílago dañado. Por el contrario, el uso de PRP derivado de sangre autóloga ha emergido recientemente como un potencial tratamiento regenerativo de la SCH[43,44]. Como se describió anteriormente, el tratamiento con PRP (basada en la acción de factores de crecimiento plaquetarios) constituyen un método regenerativo alternativo para la reparación de úlceras, tejido muscular y óseo y recuperación tisular luego de intervenciones quirúrgicas. Evidencias obtenidas en el contexto de la inyección de PRP intra-articular para el tratamiento de artritis reumatoidea y osteoartritis idiopática indican que el PRP estimula la proliferación de células que conforman las articulaciones (osteoblastos, fibroblastos, células del tendón, condrocitos y células madre mesenquimales)[45]. A diferencia de estas artropatías cuya etiología difiere ampliamente de la observada en pacientes con hemofilia, las evidencias clínicas acerca del uso de PRP en el tratamiento de la SCH son mucho más escasas y recientes e incluyen sólo dos trabajos publicados. Estos corresponden a dos ensayos clínicos, el primero publicado por Teyssler y

colaboradores[44] y el segundo realizado por el grupo dirigido por el Dr Caviglia, jefe del Servicio de ortopedia y traumatología del Hospital Fernández y colaborador de este proyecto[43]. Luego del tratamiento intra-articular con PRP en pacientes con SCH ambos grupos de trabajo observaron mejoría significativa en todos los parámetros clínicos evaluados incluyendo disminución de dolor, disminución de volumen de fluido sinovial y disminución de hemorragias sin observarse efectos adversos. Controversialmente, debido a la escasez de evidencias experimentales y clínicas que expliquen las bases biológicas subyacentes al uso del PRP en SCH, como también a la escasez de ensayos clínicos que prueben la eficacia y seguridad de estas terapias a largo plazo, las mismas no deben ser aún recomendadas para el tratamiento de SCH fuera de su evaluación en ensayos clínicos[45]. En este trabajo se propone generar evidencia que contribuya a disipar estas controversias y a generar las bases que expliquen el fundamento biológico del PRP en SCH.

OBJETIVOS

Dilucidar el rol de los neutrófilos como efectores del daño articular de la SCH a través de las NETs y evaluar la capacidad del PRP de prevenir dicho daño.

Objetivos específicos:

1) Analizar la composición celular del líquido sinovial.
2) Identificar la presencia de NETs en el líquido sinovial de pacientes con SCH analizando la marcación de complejos ADN-Elastasa, y la cuantificación de ADN total y de complejos ADN- Elastasa.
3) Evaluar la asociación entre los niveles de NETs y los parámetros clínicos.
4) Analizar la capacidad de líquido sinovial de inducir liberación de NETs *in vitro* en presencia y ausencia de plasma.

HIPÓTESIS

1) Los neutrófilos son reclutados a la cavidad sinovial de pacientes con SCH, forman NETs de manera localizada e inducen daño articular.
2) El agregado de plasma fresco en la cavidad sinovial ejercería un efecto citoprotector y NETolítico ante el daño articular causado por las NETs sinoviales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra.

Las muestras de sangre periférica y líquido sinovial fueron obtenidas por punción venosa e intra- articular, respectivamente de pacientes con SCH que asisten al Hospital Juan A. Fernández (CABA). Dichos pacientes se encuentran enmarcados en un protocolo de investigación clínica para el tratamiento de SCH con PRP (CEIHF Nº201811) dirigido por el Dr. Horacio Caviglia (jefe de la División de Ortopedia y Traumatología del H. Fernández) y su equipo (María E. Landro, Carla Daffunchio y Ana L. Douglas Price) quienes forman parte del grupo colaborador del presente proyecto. La punción intra-articular para extraer líquido sinovial es una práctica habitual en estos pacientes y disminuye el dolor causado por la presencia

excesiva de líquido en la articulación (que puede llegar a 100ml en articulaciones grandes). De esta manera, la obtención de las muestras de líquido sinovial para este proyecto no generó molestias significativas extras de la práctica médica habitual. Los pacientes fueron tratados en el quirófano en condiciones de asepsia y el PRP fue preparado en sistema cerrado en condiciones de esterilidad. Se estudiaron 19 pacientes, los cuales fueron evaluados y tratados por los mismos profesionales durante el desarrollo de todo el estudio. La evaluación clínica fue realizada por el personal de la División de ortopedia y traumatología del H. Fernández. Previo al tratamiento se les realiza a todos los pacientes una resonancia magnética nuclear (RMN) y se los evaluó según el *score* de salud de articulación hemofílica (HJHS, del inglés *Hemophilia Joint Health*).

Criterio de inclusion.

Pacientes con hemofilia que padecen sinovitis crónica de tobillo y/o codo y/o rodilla y/o hombro entre los 3 años y los 80 años. Diagnosticado por radiografía, ecografía y/o resonancia magnética nuclear y por el examen clínico, los cuales dieron su consentimiento libre y esclarecido por escrito (consentimiento informado). En caso de ser menores de edad, los padres, tutores o encargados, así como también el menor, firmaron el consentimiento informado correspondiente siguiendo los lineamientos establecidos en el Código Civil y Comercial de la Nación.

Criterio de exclusion.

Pacientes con artropatía hemofílica grado 5 según la clasificación radiológica de Arnold y Hilgartner (anquilosis ósea) y evaluación clínica. Otro criterio de exclusión son los que limitan la inyección intra-articular como mal estado de la piel (pérdida de la barrera cutánea), accesos venosos alterados o infección activa en la articulación.

Consideraciones éticas.

Se mantuvo la confidencialidad de toda la información de este estudio según pautas de la legislación nacional e internacional vigente. El nombre de los sujetos de estudio cuyas muestras o información han sido utilizadas solidariamente no fue almacenado en ningún registro ni revelado en ninguna publicación o presentación de los resultados del estudio. Se cumplieron con los requisitos éticos, legales y jurídicos establecidos en las normas bioéticas nacionales –Disposición ANMAT 6677/10– e internacionales - Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones; así como también la Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO, del 11/11/1997. Este estudio cuenta con la aprobación de los Comités de Ética del Hospital Fernández (protocolo original Nº201652, extendido a este proyecto en Nº201811) y de la Academia Nacional de Medicina (TI, Nº12714/18/X), como también de los Comités de Docencia e Investigación y Directivos de ambas Instituciones.

Tinción Giemsa.

Las muestras de líquido sinovial fueron colocadas y esparcidas en un portaobjetos realizando un frotis (Figura 8). Luego del secado, se cubrieron las superficies con una mezcla de azul de metileno, azur-eosina y metanol durante 8 segundos. En aquel lapso de tiempo el metanol fijó las muestras. Además, el azul de metileno y azul (como tinte básico) y eosina (como tinte ácido) tiñeron las muestras. Después de lavar el exceso de Giemsa con agua, se las dejó secar y luego se tomaron fotografías

con una cámara acoplada a un microscopio óptico.

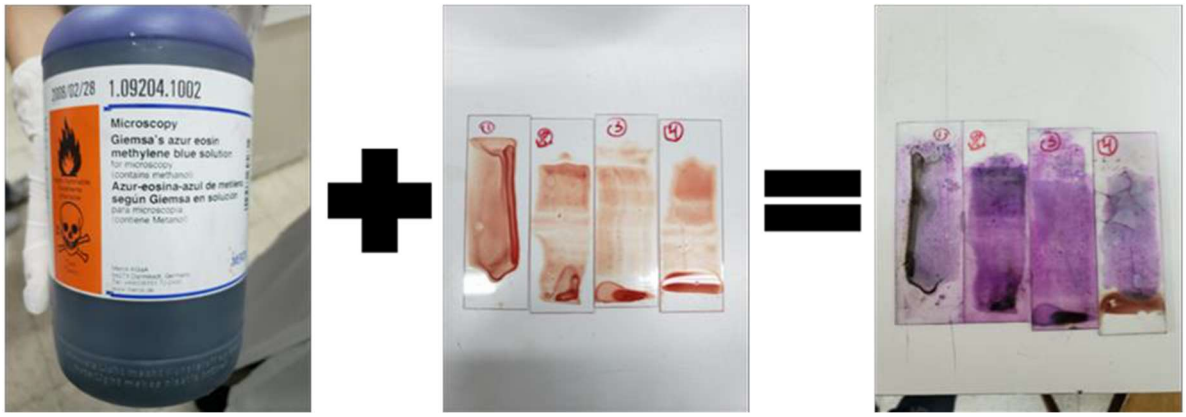


Figura 8. Esquema del protocolo de técnica de tinción Giemsa. Los portaobjetos conteniendo el frotis de líquido sinovial fueron teñidos con Giemsa y visualizados utilizando un microscopio.

Citocentrifugación.

Se ensambló la cámara citocentrífuga con sus respectivas partes (portaobjeto, papel absorbente y compartimiento de plástico) (Figura 9A), se sembraron 100µl de muestra de líquido sinovial (Figura 9B) y se colocó la cámara en una citocentrífuga (Figura 9C). Luego de la centrifugación (600rpm, 4min) la cámara fue desarmada y se obtuvo la muestra adherida a la superficie del portaobjetos (Figura 9D).

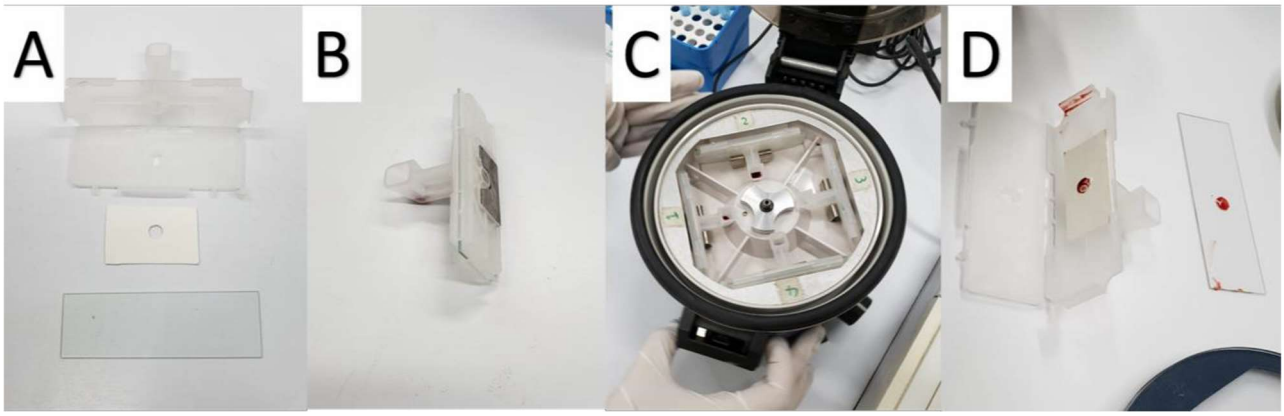


Figura 9. Esquema de la técnica de citocentrifugación. Armado de cámara y depósito de la muestra de líquido sinovial adherido luego de un ciclo de citocentrífuga.

Marcación de NETs.

Sobre la muestra de líquido sinovial adherida a la superficie del portaobjeto se colocó paraformoaldehído (PFA) con el objetivo de fijar las células al portaobjeto. Luego del lavado se utilizó una solución de bloqueo conteniendo suero fetal bovino (SFB) 5%. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario (anti-elastasa humana) generado en conejos. Después del lavado con solución fisiológica se añadió el intercalante de ADN (ioduro de Propidio) junto con el anticuerpo secundario (generado en cabra) que reconoce la porción constante de anticuerpos generados en conejos. Este último está acoplado a un fluoroforo que emite fluorescencia al ser excitado. El exceso de anticuerpo fue removido por lavado y para finalizar se aplicó una gota de líquido de montaje (Figura10A) y los preparados fueron visualizados con el empleo de un microscopio de fluorescencia confocal (Figura 10B).

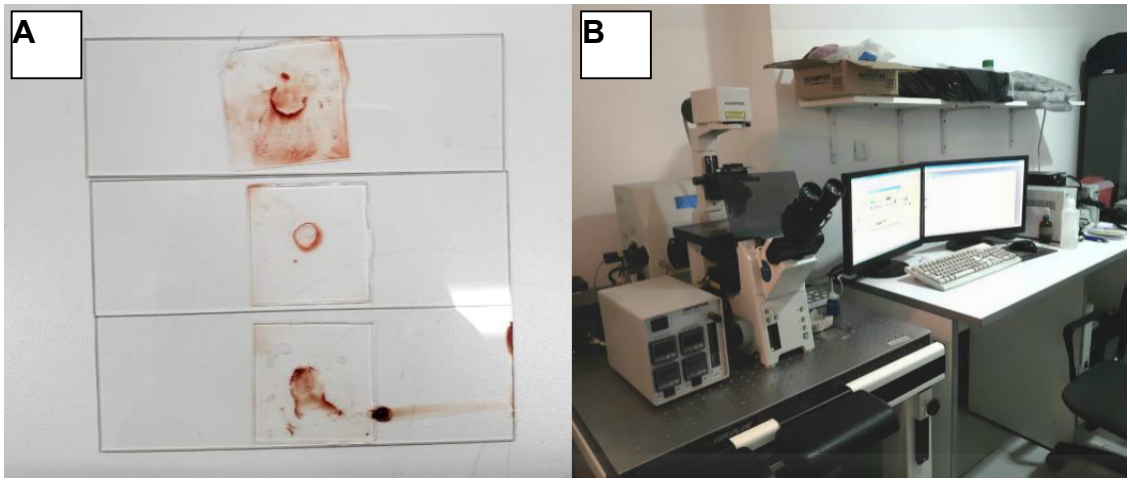


Figura 10. Resultado final de la marcación de NETs. A) Preparados de líquido sinovial luego del sometimiento a distintas sustancias propias de la marcación de NETs.
B) Microscopio de fluorescencia confocal.

Procesamiento de sangre, obtención de plasma y neutrófilos purificados.

Partiendo de muestras de sangre entera se realizó una centrifugación para separar a los componentes formes de la sangre en función de la densidad celular (Figura 11). Luego de la centrifugación, las plaquetas (células con menor densidad) se obtuvieron en la fase superior, seguidos por los glóbulos blancos (GB) formando un colchón sobre el paquete de GR (apilados en la fase inferior). Se aisló la fase de PRP y se activó la cascada de coagulación al restituir los niveles de Ca^{2+} quelados por el anticoagulante con el agregado de $CaCl_2$. Este proceso permitió la generación de trombina que, como se expresó anteriormente, ésta es el último factor en la cascada de coagulación que polimeriza el fibrinógeno en fibrina, y además es considerada el activador plaquetario más potente que induce la liberación de los gránulos plaquetarios conteniendo factores de crecimiento. Al cabo de 40 min de coagulación, el coágulo resultante fue exprimido y la porción líquida conteniendo plasma y los factores de crecimiento fue separada y utilizada para los distintos experimentos.

Por otro lado, la fase compuesta por los GR y leucocitos fue sembrada sobre Ficoll, sustancia líquida comercial compuesta por una mezcla de azúcares que interactúa de manera diferencial con los leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos) y los polimorfonucleares (principalmente neutrófilos y con un mínimo porcentaje de eosinófilos y basófilos). Luego de la centrifugación se descartó la fase superior que contenía plasma pobre en plaquetas, linfocitos y monocitos. A la fase compuesta principalmente por neutrófilos y GR se le colocó Dextrán (mezcla comercial de azúcares). Luego de 20 min de decantación de GR, se separó la fase superior conteniendo neutrófilos contaminados por una pequeña fracción de GR. Para purificar los neutrófilos se realizó una centrifugación y posterior lisis selectiva de GR con agua. Para finalizar, se realizó una última centrifugación que permitió descartar los fragmentos de GR restantes extrayendo neutrófilos purificados.

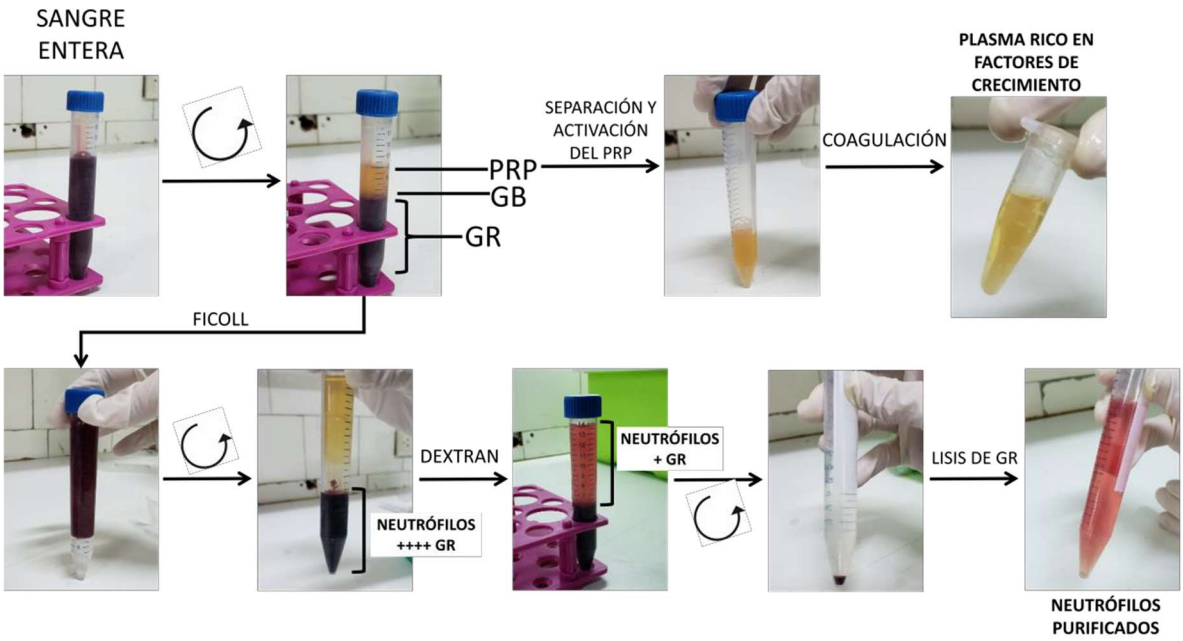


Figura 11. Procesos secuenciales de obtención de plasma rico en factores de crecimiento y purificación de neutrófilos.

Determinación de niveles de ADN en líquido sinovial y plasma.

Para determinar los niveles de ADN en el líquido sinovial y plasma utilizamos un equipo que detecta fluorescencia (Figura 12A) a través del empleo de PicoGreen. Ésta molécula se intercala en el ADN doble cadena y al hacerlo emite fluorescencia. Para cuantificar la cantidad de ADN en el líquido sinovial se empleó una curva de calibración que asocia a las Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF) en función de la concentración conocida de ADN (□g/ml) o estándar (Figura 12B). Con la ecuación correspondiente a la curva se pudo determinar la cantidad de ADN propio de cada muestra de líquido sinovial.

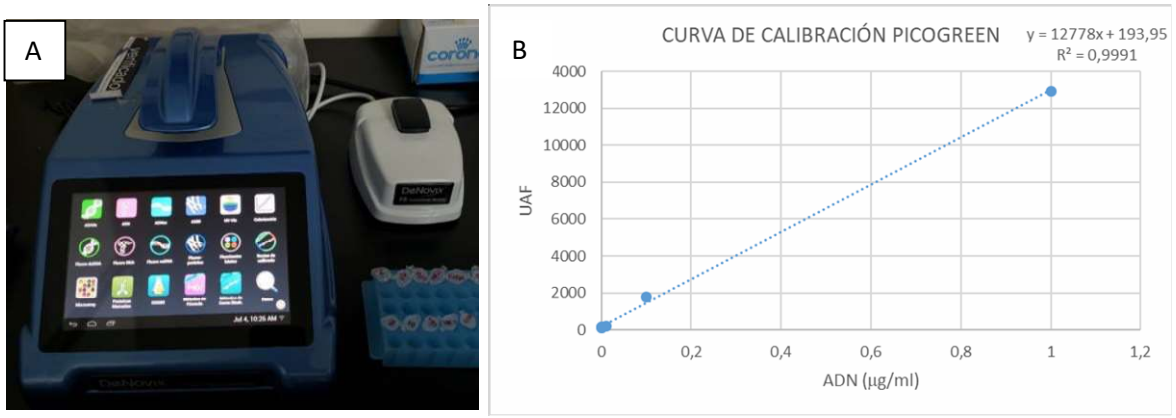


Figura 12. Determinación de niveles de ADN en líquido sinovial. A) Se determinaron con un equipo que detecta fluorescencia luego del agregado del intercalante Picogreen. B) Se realizó una curva de calibración de UAF en función de la concentración de ADN con el empleo de un estándar.

Determinación de ADN-Elastasa en líquido sinovial y plasma.

Para determinar la presencia del complejo ADN-Elastasa en el líquido sinovial y plasma se realizó la técnica ELISA (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay) (Figura 13). Para ésta, se adhirió el anticuerpo primario (o anticuerpo de captura) anti-elastasa a la superficie de la placa mediante el uso de una sustancia básica conocida como solución de captura (Figura 13A). Se dejó incubar a 4°C durante una noche. Sucesivamente, se lavó el exceso del anticuerpo primario y se colocó la muestra de líquido sinovial o plasma, dejándosela incubar por dos horas en un agitador (Figura 13B). Nuevamente, se lavó el exceso de muestra y se agregó el anticuerpo secundario (o de detección) anti-nucleosomas presentes en el ADN (a partir de ahora "anti-ADN"), éste tiene acoplado la enzima peroxidasa HRP (del inglés enzyme horseradish peroxidase) (Figura 13C). Se realizó un lavado donde se quitó el exceso del anticuerpo secundario. Finalmente, se incorporó el sustrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) que es metabolizado por la enzima HRP generando como producto de color (Figura 13D). El color fue detectado con el empleo de un lector de microplacas (Figura 13E) y los resultados fueron expresados en unidades relativas de absorbancia.

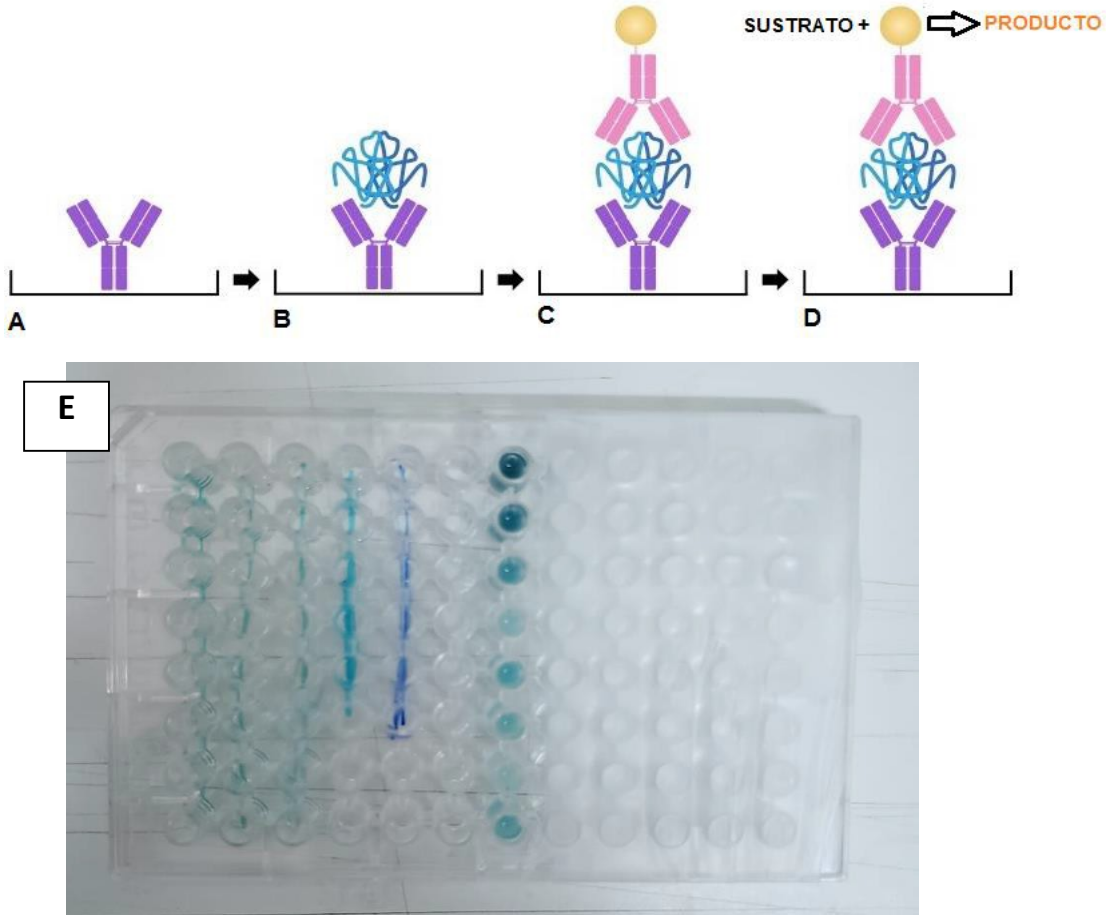


Figura 13. Esquema de la técnica ELISA. A) Anticuerpo de captura anti-elastasa adherido a la placa. B) Anticuerpo unido a Elastasa. C) Unión del anticuerpo de detección al ADN (del complejo ADN-Elastasa) que está acoplado a una enzima Peroxidasa (círculo amarillo). D) Agregado del sustrato TMB que es metabolizado en un producto que da color. E) Placa con muestras de líquido sinovial y plasma una vez finalizada la técnica de ELISA.

Formación de NETs *in vitro.*

Los neutrófilos purificados de sangre periférica fueron incubados con liquido sinovial de los pacientes en presencia o ausencia de plasma y la formación de NETs se indujo por 2 horas a 37ºC. Luego, los neutrófilos y las NETs fueron adheridas a vidrios con el empleo de una citocentrífuga y se procedió con la técnica de marcación de complejos ADN-Elastasa para visualizar NETs por microscopía de fluorescencia confocal. Además, se separó una fracción para evaluar la formación de NETs de manera cuantitativa mediante la determinación de ADN-Elastasa por ELISA.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados utilizando el software Graph Pad Prism 8. Dependiendo del experimento se utilizó el test de Student (paramétrico) o Mann-Whitney-Wilcoxon (no paramétrico) para evaluar las diferencias entre dos medias dentro de la misma variable. La asociación entre dos variables fue evaluada calculando los coeficientes de Pearson o Spearman dependiendo de si la distribución de las variables fue normal o no, respectivamente. Los valores fueron expresados como la media ± SEM y se consideró significativo un $P<0.05$.

RESULTADOS

Análisis de la composición celular del líquido sinovial de pacientes con SCH.

Teniendo en cuenta que la composición de células presentes en el líquido sinovial es un parámetro indicador del estado de salud de la articulación, la misma fue inicialmente estudiada por microscopía empleando la tinción de Giemsa. Esta técnica de tinción colorimétrica permite diferenciar la morfología, tamaño y disposición del núcleo dentro de la célula, el citoplasma y la dimensión celular. En la Figura 14 se muestran las imágenes de microscopía óptica correspondientes a las muestras de líquido sinovial de 6 pacientes distintos. En la primera imagen (A) se visualizó la presencia de linfocitos caracterizados por un núcleo (teñido de azul oscuro) ocupando la totalidad de la superficie celular. Además, se evidenció la tinción de las hebras fibrilares de la matriz sinovial. En la segunda imagen (B) se visualizó la presencia de células mononucleares sinoviales constitutivas de las articulaciones. Ambas imágenes reflejan muestras de líquido sinovial similar al que se observa en una muestra proveniente de una persona sana, indicando que el deterioro de la articulación de estos pacientes no se encuentra en estado avanzado. En la imagen superior derecha (C) se observó la alta presencia de linfocitos, eritrocitos apilados (de color rosa o naranja pálidos) y neutrófilos (con su núcleo característico polimorfonuclear) indicando la ocurrencia de un sangrado articular reciente. En la cuarta imagen (D) se observa la presencia de eritrocitos con morfología alterada indicando la ocurrencia de un sangrado no reciente anterior a la toma de la muestra. Además, se captó a un neutrófilo fagocitando a un eritrocito, mecanismo fisiológico para eliminar células envejecidas. También se observa una célula dendrítica normalmente presente en el líquido sinovial con función regulatoria. La siguiente imagen (E) muestra a un grupo de macrófagos (de gran tamaño) fagocitando depósitos de hemosiderina (azul oscuro). Éstos se forman en consecuencia de la presencia de hemoglobina libre en la articulación por largos periodos de tiempo e indican un proceso patológico crónico avanzado. Para finalizar, la última imagen (F) muestra la presencia de células de revestimiento sinovial libres reflejando el desmoronamiento y deterioro

avanzado de la membrana sinovial.

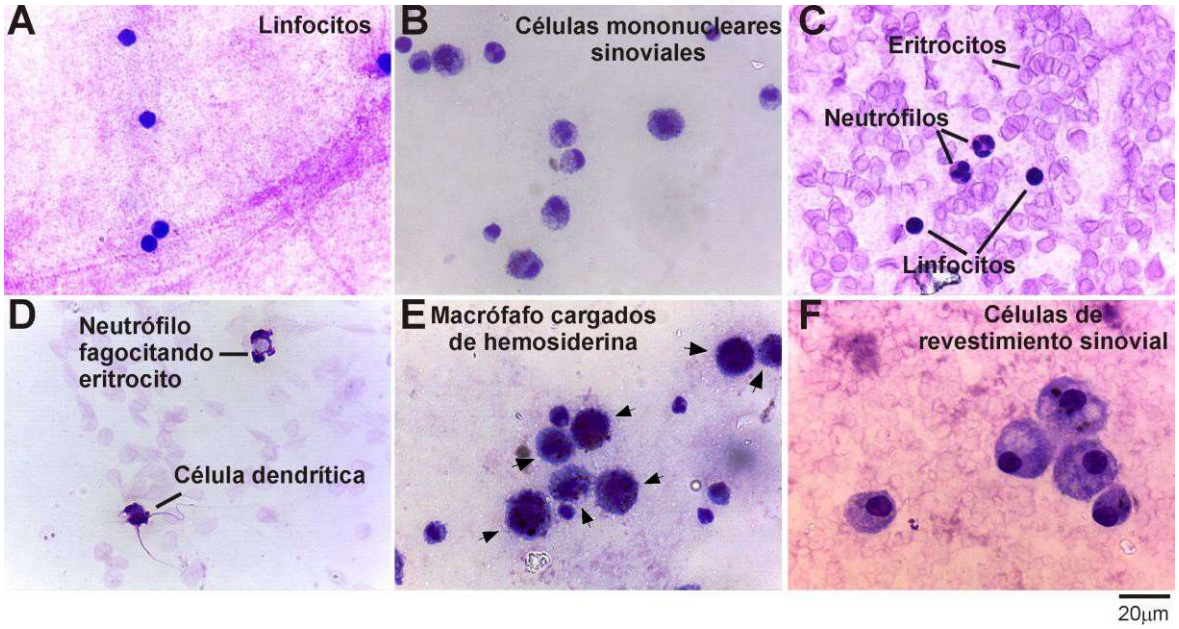


Figura 14. Análisis de la composición celular del líquido sinovial. Imágenes del líquido sinovial teñido con el colorante Giemsa representativas de seis pacientes independientes obtenidas por microscopía óptica. Magnificación 1000X.

Estadios en la formación de NETs presentes en el líquido sinovial de pacientes con SCH.

Con el objetivo de comprobar si la formación de NETs se produce en el líquido sinovial, las muestras de pacientes con SCH fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia confocal en donde se marcaron simultáneamente al ADN y a la elastasa. La visualización de cada uno de estos parámetros permite ver la morfología de los núcleos celulares, la presencia de la elastasa y la disposición de la misma, los cuales permiten inferir distintos estadios en la formación de NETs. En la Figura 15A, en la parte superior del primer canal (columna) se refleja un núcleo polilobulado característico de los neutrófilos (rojo). En el segundo, se observa la elastasa (verde) intacta en los gránulos del citoplasma manteniéndose la integridad de la membrana y liberándose la NET desde un polo de la célula. En el tercer canal, se muestra el solapamiento de las dos anteriores imágenes señalando (flecha blanca) el polo del cual se libera la NET. En la segunda fila se observaron tres células; dos de ellas resultaron ser mononucleares (una con marca positiva para elastasa y otra sin) y una polinuclear. Comparado con la figura anterior, y si bien todavía se distingue el polo de liberación de NETs, la elastasa se observa de manera más laxa perdiendo integridad de la membrana plasmática indicando un proceso más avanzado en la liberación de estas estructuras. El último canal de esta fila refleja la superposición de las imágenes anteriores. La última fila demuestra al ADN y elastasa completamente laxos y libres en el medio extracelular, en donde no se distingue a la célula que originó a la NET y reflejando un proceso de liberación completo y tardío.

Además de detectar la presencia de NETs de manera cualitativa con el empleo del microscopio confocal, es necesario contar con una técnica que permita cuantificar la cantidad de NETs sinoviales. Para ello, se detectó la fluorescencia asociada a la presencia del intercalante de ADN fluorescente Picogreen. Los valores de ADN por paciente se expresaron en un gráfico de puntos (mostrado en la Figura 15B) en

donde cada punto refleja una articulación de cada paciente diferente. La dispersión de los puntos indica la diversidad en valores de ADN presente en el líquido sinovial de la población en estudio.

Si bien se detecta la presencia de NETs de manera cualitativa a partir de la concentración de ADN de la muestra, no es seguro asumir que ésta proviene únicamente de las NETs pues, hay posibilidades de que también provenga de la necrosis. Por lo tanto, se realizó la detección del complejo ADN-Elastasa específico de NETs con la técnica ELISA. Debido a que no se posee un estándar de ADN-Elastasa no se puede realizar la cuantificación de la concentración de los complejos por lo que la técnica en este caso será semi-cuantitativa. Los valores de absorbancia asociado a la presencia de ADN-Elastasa por paciente se expresaron en un gráfico de puntos (mostrado en la Figura 15C) en donde cada punto refleja una articulación de cada paciente diferente. La dispersión de los puntos indica la diversidad en valores de ADN-Elastasa presente en el líquido sinovial de la población en estudio.

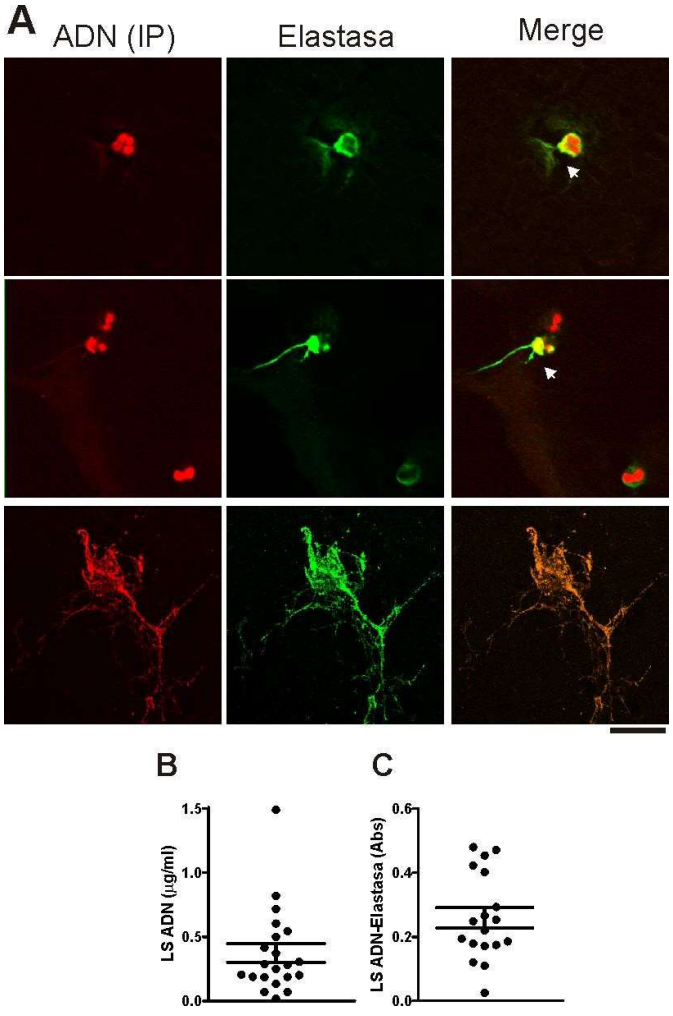


Figura 15. Estudio de la presencia de NETs sinoviales. A) Imágenes del líquido sinovial presentando fluorescencia roja en la molécula de ADN, verde en la enzima elastasa y naranja en la superposición de las mismas. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal y representativas de pacientes con SCH. Magnificación 600X (/escala 50 µm). B) Niveles de ADN en el líquido sinovial (LS) de los pacientes medido por fluorescencia asociado a la presencia del intercalante de ADN picogreen (n=21). C) Niveles de ADN-Elastasa medido por técnica de ELISA (n=18).

La formación de NETs sinovial se refleja en un parámetro sistémico.

A continuación, se evaluó si la formación de NETs que ocurre de manera localizada en el líquido sinovial de pacientes con SCH se refleja a nivel sistémico, es decir, si traspasa los límites de la articulación y llega a la circulación sanguínea. Para ello, se cuantificaron los niveles de ADN (fluorometría) y ADN-Elastasa (ELISA) en el plasma de pacientes SCH, y los valores se compararon con un grupo de donantes voluntarios sanos. En la Figura 16A se puede observar los niveles ADN plasmáticos en una población de donantes sanos y pacientes con SCH en donde cada punto representa un individuo distinto. El análisis estadístico de los datos indicó que los niveles promedio de ADN plasmático fueron significativamente mayores ($P<0.01$) en los pacientes con hemofilia comparado con los donantes sanos. Resultados similares fueron obtenidos al evaluar los niveles plasmáticos de ADN-Elastasa (Figura 16B) indicando que los pacientes con SCH tienen niveles circulantes aumentados de parámetros de NETs.

Con el objetivo de evaluar si los niveles aumentados de ADN y ADN-Elastasa plasmáticos provienen de la formación de NETs observada en la articulación, a continuación se evaluó la correlación entre los niveles plasmáticos y sinoviales de NETs en los pacientes con SCH. Para ello se empleó el software Graph Pad Prism 8 y se graficaron los niveles de ADN (Figura 16C) o ADN-Elastasa (Figura 16D) plasmáticos y sinoviales para cada uno de los pacientes representando ambos niveles como un único punto por individuo. Posteriormente se realizaron los test de correlación de Pearson o Spearman dependiendo de la distribución normal o no de los datos, respectivamente. Estos test arrojan como resultado un valor de r que indica cuánto se asocian los datos entre sí. Específicamente, r es un valor de 0 a 1 que puede ser positivo o negativo dependiendo de si la relación entre las variables es directa o inversamente proporcional. Un valor de $r<0.4$ significa correlación débil, $0.4<r<0.5$ correlación moderada, $0.5<r<0.7$ correlación alta y $r>0.7$ correlación muy alta. En las Figuras 16C-D, y aplicado a los resultados de este trabajo se puede observar que la correlación entre los niveles plasmáticos y sinoviales de ADN (Spearman $r=0.67$) o ADN-Elastasa (Pearson $r=0.75$) resultaron en correlaciones positivas altas y significativas ($P>0.01$). Estos resultados indican que los niveles plasmáticos de NETs se asocian a la formación de NETs que ocurre de manera localizada en la articulación estudiada.

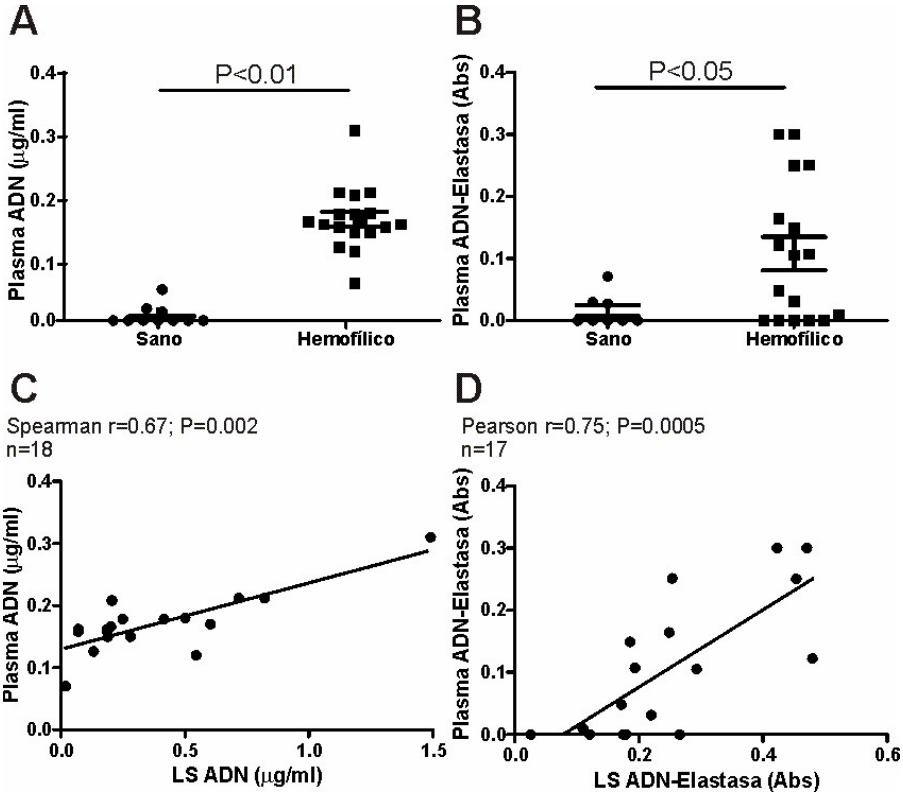


Figura 16. Parámetros de NETs sinoviales y plasmáticos. Los niveles de ADN (A) y ADN-Elastasa (B) fueron determinados en el plasma de pacientes con SCH y se compararon con los niveles presentes en plasma de donantes voluntarios sanos (n=10-18). La asociación entre los niveles plasmáticos y del líquido sinovial (LS) de ADN (C) y ADN-Elastasa (D) en los pacientes con SCH se calculó a través de los test de correlación de Spearman y Pearson con el empleo del programa GraphPadPrism 8 (n=17-18).

Correlación entre los niveles de NETs y daño articular.

Para evaluar si las NETs presentes en el líquido sinovial de los pacientes con SCH son posibles causantes del daño de la articulación, se evaluó la correlación entre los niveles de ADN y ADN- Elastasa sinoviales con el score de salud articular HJHS. Los tests de correlación de Pearson y Spearman resultaron en una correlación significativa ($p<0.05$), positiva y moderada-alta entre los valores de ADN y ADN-Elastasa con el daño articular ($r=0.52$ y $r=0.65$, respectivamente) (Figura 17A-B). Para evaluar si la asociación entre NETs sinoviales y el daño articular también se refleja de manera sistémica, las correlaciones de ADN y ADN-Elastasa plasmáticos y HJHS fueron evaluadas. Estos valores resultaron nuevamente en valores de correlación significativa, positiva y moderada-alta (Figura 17C-D). En conjunto, estos datos sugieren por un lado que las NETs formadas en la cavidad sinovial se asocian al daño articular y podrían ser posibles nuevos blancos terapéuticos de la SCH; por el otro lado indican que la formación de NETs sinovial se refleja de manera sistémica sugiriendo que la determinación de ADN y ADN-Elastasa en plasma podría ser un nuevo biomarcador de seguimiento del daño articular.

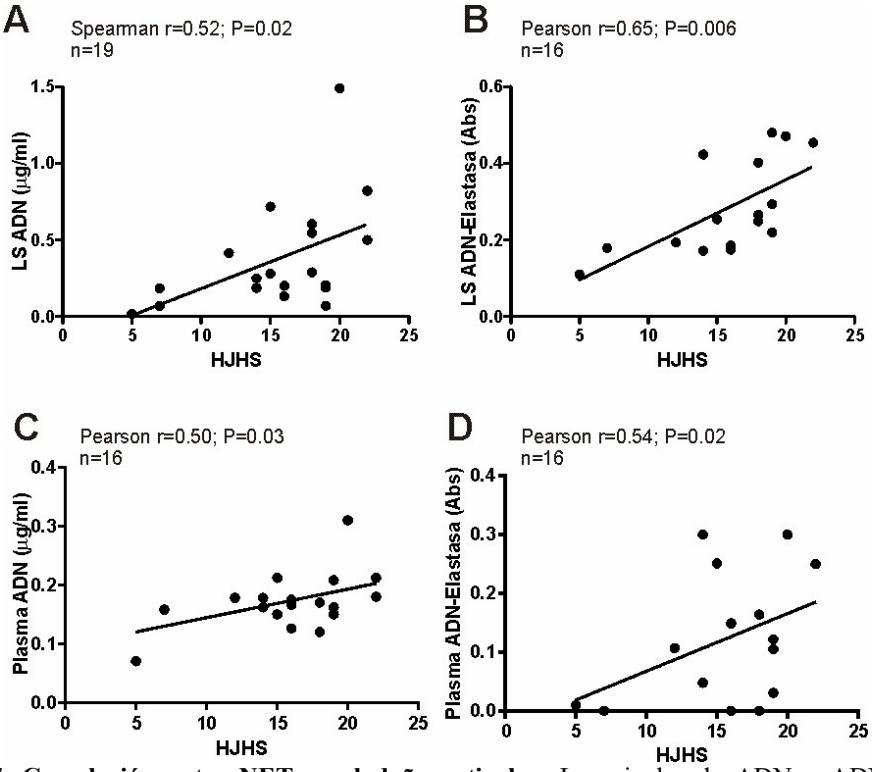


Figura 17. Correlación entre NETs y el daño articular. Los niveles de ADN y ADN-Elastasa fueron determinados en el plasma y líquido sinovial (LS) de pacientes con SCH. El daño articular se determinó por evaluación clínica con el score de salud articular HJHS. Con el empleo del programa GraphPadPrism 8 se calculó la correlación entre niveles sinoviales y plasmáticos de ADN y HJHS (A y C) y ADN-Elastasa y HJHS (B y D) (n=16-19).

El líquido sinovial de pacientes con SCH contiene factores pro-NETóticos activos que se inhiben en presencia de plasma.

Para demostrar que el líquido sinovial posee sustancias pro-NETóticas, se evaluó la capacidad de este fluido de inducir la formación de NETs *in vitro* provenientes de neutrófilos frescos purificados de sangre periférica. Como se observa en la Figura 18A, los neutrófilos no estimulados, es decir, en ausencia de líquido sinovial, presentaron una morfología celular característica de estas células en reposo incluyendo el núcleo polilobulado rodeado del citoplasma conteniendo gránulos con elastasa. En cambio, luego del agregado del líquido sinovial se evidenció la formación de NETs caracterizada por la presencia de hebras de ADN conteniendo adherida elastasa. Este proceso de liberación de NETs inducidas por el líquido sinovial no fue observado en presencia de PRP. En concordancia con las imágenes de microscopía, la determinación de los niveles de ADN-Elastasa indicó que mientras los neutrófilos no estimulados no fueron capaces de liberar NETs, este proceso fue significativamente aumentado en presencia de líquido sinovial. Los niveles de ADN- Elastasa retornaron a los valores de liberación basal en presencia de PRP (Figura 18B). En conclusión, estos resultados indican que el líquido sinovial posee factores pro-NETóticos que estimulan la formación de NETs y este proceso es inhibido por el PRP, posiblemente debido a la presencia de sustancias NETolíticas del plasma.

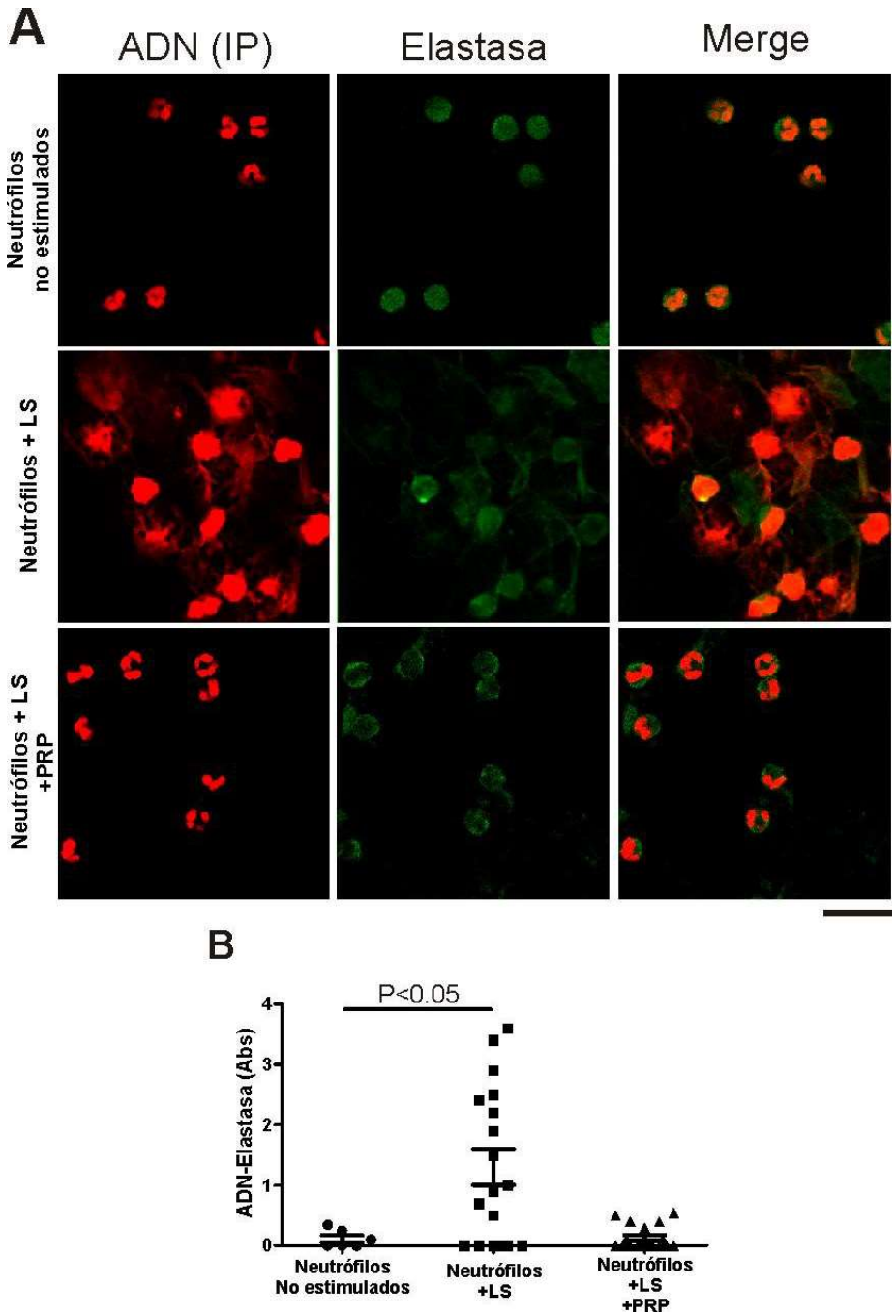


Figura 18. Estudio de la inducción de NETs *in vitro*. A) Los neutrófilos purificados de sangre periférica fueron incubados o no con líquido sinovial (LS) en presencia o ausencia de PRP. Luego de 2 horas de incubación a 37ºC (CO2 5%) las células fueron adheridas a vidrios con el empleo de una citocentrífuga, fijadas y marcadas con el intercalante de ADN ioduro de propidio (IP) (rojo) y un anticuerpo que reconoce elastasa (verde). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal y son representativas de 18 experimentos de pacientes independientes. Magnificación 600X (barra de escala=50µm). B) Los niveles de ADN-Elastasa provenientes de los neutrófilos incubados con LS en presencia o ausencia de PRP fueron determinados por ELISA (n=18).

DISCUSIÓN

En este trabajo se describe un nuevo mecanismo celular denominado formación de NETs a través del cual los neutrófilos inducen daño articular en pacientes con SCH. Para explicar este mecanismo, la primera hipótesis del trabajo plantea que los neutrófilos que ingresan a la articulación durante el sangrado forman NETs en la cavidad sinovial (Figura 19, 1-2). Efectivamente, el análisis de los frotis de fluido sinovial teñidos con Giemsa junto con las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal confirmaron la presencia de neutrófilos como también de distintos estadios en la formación de NETs.

Habiendo demostrado que las NETs están presentes en la cavidad sinovial de los pacientes con SCH, la siguiente hipótesis plantea que estas estructuras inducen daño de los condrocitos, unidad celular funcional del cartílago articular (Figura 19, 3). Si bien no se evaluó la muerte de condrocitos, el análisis estadístico demostró la correlación entre los niveles solubles de NETs, ADN y ADN-Elastasa, con el score clínico HJHS. Estos resultados permiten inferir que la formación de NETs está asociada al daño de la articulación en pacientes con SCH y que la misma podría ser un nuevo blanco terapéutico de esta patología. Además, los elevados niveles de ADN y ADN-Elastasa en el plasma de los pacientes, y su correlación con los niveles presentes en la cavidad sinovial revelaron que la formación de NETs, que ocurre localizada en la articulación, se refleja a nivel sistémico. Esto podría llevar a plantear a la determinación de NETs plasmática como un posible biomarcador de evolución y seguimiento de SCH. Por último, la hipótesis de este trabajo plantea que el plasma contenido en el PRP previene el daño ocasionado por las NETs, ya sea al impedir su formación o al degradar la estructura tridimensional de las mismas (Figura 19, 4). En concordancia, los estudios *in vitro* revelaron que la formación de NETs inducida por factores solubles presentes en el líquido sinovial de los pacientes con SCH se inhibe en presencia de plasma. Este podría sugerirse como un mecanismo para explicar el efecto terapéutico de la inyección intra-articular de PRP en pacientes con SCH. A futuro, resta determinar el posible efecto regenerativo ejercido por los factores de crecimiento provenientes de las plaquetas sobre los condrocitos (Figura 19, 5).

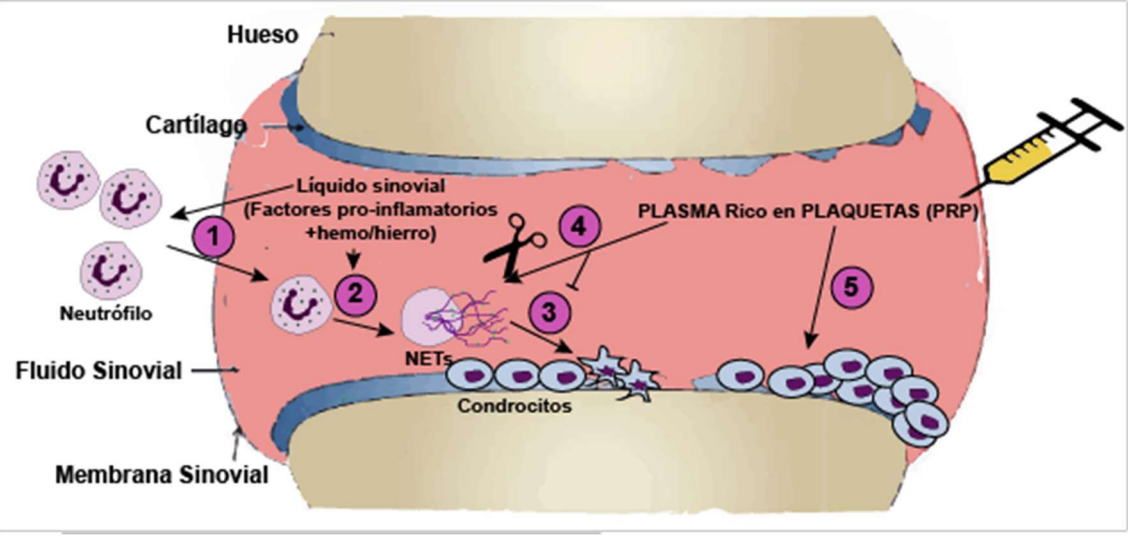


Figura 19. Esquema secuencial de mecanismos involucrados en la patogénesis de SCH y acción terapéutica del PRP propuestos en el trabajo.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indican:

1) Distintos estadios en la formación de NETs están presentes en el líquido sinovial de pacientes con SCH.

2) Los niveles de ADN y ADN-Elastasa sinoviales correlacionan con el peor pronóstico de daño articular sugiriendo a las NETs como posibles nuevos blancos terapéuticos de la SCH.

3) Los niveles de ADN y ADN-Elastasa plasmáticos y sinoviales correlacionan entre sí sugiriendo que en la formación de NETs sinovial se refleja en un parámetro sistémico que podría ser utilizado como biomarcador de evolución de daño articular.

4) El líquido sinovial de pacientes con SCH contiene factores pro-NETóticos activos que inducen liberación de NETs en neutrófilos aislados de sangre periférica. Este proceso se inhibe en presencia de plasma sugiriendo que éste podría ser el mecanismo biológico subyacente al efecto terapéutico de la inyección intra-articular de PRP en estos pacientes.

En conjunto, los hallazgos obtenidos en este trabajo revelaron un posible nuevo blanco terapéutico asociado al daño articular en SCH; un biomarcador de seguimiento de la misma; y sentaron las bases para entender el efecto terapéutico del PRP en estos pacientes. A futuro estos resultados podrían ser extrapolados a la clínica para contribuir a la mejora de estos pacientes y disminuir el impacto en el presupuesto de salud pública nacional.

REFERENCIAS

1. Pulles AE, Mastbergen SC, Schutgens RE, Lafeber FP, van Vulpen LF. Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy. *Pharmacol Res*. 2017;115:192-199.
2. https://www.slideshare.net/JuanLeoRM/cascada-de-coagulacin-75032884.
3. O'Hara J, Walsh S, Camp C, et al. The impact of severe haemophilia and the presence of target joints on health-related quality-of-life. *Health Qual Life Outcomes*. 2018;16(1):84.
4. Melchiorre D, Manetti M, Matucci-Cerinic M. Pathophysiology of Hemophilic Arthropathy. *J Clin Med*. 2017;6(7).
5. CIPPEC. Un seguro nacional de enfermedades catastróficas: fundamentos para su implementación. https://salud.misiones.gob.ar/wp-content/uploads/2017/08/Enfermedades_catastroficas_-_tobar-1.pdf. 2012.
6. Federico T. Seguro Nacional de Enfermedades Catastróficas: Cómo y por qué. http://www.consultordesalud.com.ar/admin/ediciones/pdfs/PDF_201188135248602.pdf; 2011.
7. Peyron I. Role of the proinammatory environment in the immunogenicity of therapeutic factor viii in patients with severe hemophilia A. NNT : 2014PA066455 https://telarchives- ouvertesfr/tel-01127588; 2014.
8. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to

neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-241.

9. Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, et al. Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(6):1753-1768.
10. Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, et al. NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans. *Diabetes*. 2016;65(4):1061-1071.
11. Leffler J, Prohaszka Z, Mikes B, et al. Decreased Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Shiga Toxin-Associated Haemolytic Uraemic Syndrome. *J Innate Immun*. 2017;9(1):12-21.
12. Jimenez-Alcazar M, Rangaswamy C, Panda R, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017;358(6367):1202-1206.
13. Spengler J, Lugonja B, Ytterberg AJ, et al. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(12):3135-3145.
14. Logters T, Paunel-Gorgulu A, Zilkens C, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res*. 2009;27(11):1401-1407.
15. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol*. 2004;173(3):2023-2030.
16. Kono M, Saigo K, Takagi Y, et al. Heme-related molecules induce rapid production of neutrophil extracellular traps. *Transfusion*. 2014;54(11):2811-2819.
17. Kono M, Saigo K, Yamamoto S, et al. Iron-chelating agent, deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap formation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(10):915-920.
18. Ohbuchi A, Kono M, Kitagawa K, Takenokuchi M, Imoto S, Saigo K. Quantitative analysis of hemin-induced neutrophil extracellular trap formation and effects of hydrogen peroxide on this phenomenon. *Biochem Biophys Rep*. 2017;11:147-153.
19. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Nauman P, et al. Cytokines in the pathogenesis of hemophilic arthropathy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017.
20. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535.
21. Abrams ST, Zhang N, Dart C, et al. Human CRP defends against the toxicity of circulating histones. *J Immunol*. 2013;191(5):2495-2502.
22. Chaaban H, Keshari RS, Silasi-Mansat R, et al. Inter-alpha inhibitor protein and its associated glycosaminoglycans protect against histone-induced injury. *Blood*. 2015;125(14):2286-2296.
23. Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, et al. Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. *Sci Signal*. 2014;7(343):ra88.
24. Iba T, Nagakari K. The effect of plasma-derived activated protein C on leukocyte

cell-death and vascular endothelial damage. *Thromb Res*. 2015;135(5):963-969.

25. Okubo K, Kamiya M, Urano Y, et al. Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine*. 2016;10:204-215.
26. Schott U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2016;24:48.
27. Schneider AE, Sandor N, Karpati E, Jozsi M. Complement factor H modulates the activation of human neutrophil granulocytes and the generation of neutrophil extracellular traps. *Mol Immunol*. 2016;72:37-48.
28. Boettcher M, Eschenburg G, Mietzsch S, et al. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):15377.
29. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9813-9818.
30. Leffler J, Stojanovich L, Shoenfeld Y, Bogdanovic G, Hesselstrand R, Blom AM. Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(1):66-70.
31. White P, Sakellari D, Roberts H, et al. Peripheral blood neutrophil extracellular trap production and degradation in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2016;43(12):1041-1049.
32. Michelson AD. Platelets. *Platelets*. 2013;Third Edition.
33. Jurk K, Kehrel BE. [Pathophysiology and biochemistry of platelets]. *Internist (Berl)*. 2010;51(9):1086, 1088-1092, 1094.
34. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105 Suppl 1:S13-33.
35. Etulain J, Negrotto S, Schattner M. Role of platelets in angiogenesis in health and disease. *Curr Angiogenesis*. 2014;3(1):1-10.
36. Forbes SJ, Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med*. 2014;20(8):857-869.
37. Shin-Chen P. Burn blister fluids in the neovascularization stage of burn wound healing: A comparison between superficial and deep partial-thickness burn wounds. *Burns & Trauma*. 2013;1(1).
38. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 1987;10(1):47-50.
39. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev*. 2013;27(2):77-89.
40. Greppi N, Mazzucco L, Galetti G, et al. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals*. 2011;39(2):73-80.
41. Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. Review. *Platelets*.

2018.

42. Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA. Safety of radiation exposure after radiosynovectomy in paediatric patients with haemophilia. *Haemophilia*. 2015;21(4):411-418.
43. Caviglia H, Landro ME, Daffunchio C, et al. Platelet Rich Plasma for Chronic Synovitis Treatment in Patients with Haemophilia. *Haemophilia*. 2017;23(4):613-619.
44. Teyssler P, Kolostova K, Bobek V. The impact of platelet-rich plasma on chronic synovitis in hemophilia. *Acta Orthop Belg*. 2014;80(1):11-17.
45. Rodriguez-Merchan EC. Platelet-rich plasma intra-articular injections for haemophilic synovitis: Scientific knowledge does not support its use. *Haemophilia*. 2017;23(5):e486-e487.

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES GENÉTICAS EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR EN ARGENTINA

Ariela F. Fundia, Juan Antonio Mazzei, María Belén Fontecha, Rosario Anadón

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

ANTECEDENTES

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad rara y progresiva que se caracteriza por la oclusión de las arteriolas pulmonares, insuficiencia respiratoria progresiva, disfunción ventricular derecha, insuficiencia cardiaca y muerte prematura (Aldred, 2006). La consiguiente morbilidad y mortalidad de esta enfermedad es el resultado de la falla del ventrículo derecho para compensar el aumento en la presión arterial pulmonar (Mazzei, 2011). Esta patología incluye diferentes formas que comparten un cuadro clínico similar y cambios patológicos de la microcirculación pulmonar prácticamente idénticos. Se clasifican en enfermedad hereditaria (HAPH), idiopática (HAPI) o asociado a la exposición a drogas/toxinas u otras condiciones médicas (Galiè, 2016). Los datos epidemiológicos internacionales demuestran una prevalencia de 5 a 25 casos/millón de habitantes y una incidencia de 1 a 2,4 casos/año/millón de habitantes (Humbert et al., 2006). La edad promedio de presentación es entre los 50 y 65 años, pero puede presentarse en cualquier edad y el inicio en la infancia no es raro. En Argentina, un estudio epidemiológico reveló una tasa anual de mortalidad por HAPI entre 1,39 y 2,39 muertes/1.000.000 habitantes (promedio 76 muertes/año), con un predominio en el sexo femenino y la mortalidad más elevada se registró en los mayores de 70 años (Mazzei, 2015).

La patogénesis de la HAP es complicada y multifactorial, y su progresión aún es parcialmente comprendida. Como la anormalidad genética más prevalente en la HAP, se ha identificado que las mutaciones en el gen que codifica el receptor tipo 2 de la proteína morfogenética ósea (*BMPR2*) se asocia con el desarrollo de la HAPH y la HAPI (Ma y Chung, 2017). *BMPR2* está mutado en aproximadamente el 75% de los casos con HAPH y el 25% de las HAPI (Machado, 2009; Soubrier, 2013). Por otro lado, se han identificado alteraciones poco frecuentes en los genes *ALK1 (ACVRL1), ENG, SMAD9, KCNK3, CAV1, GDF2* (*BMP9*), entre otros (Garcia-Rivas et al., 2017). Actualmente, estas mutaciones raras también tienen un alto grado de evidencia de asociación con el origen de HAP. Los pacientes con una mutación patogénica se diagnostican a edad más temprana, presentan mayor PAPm, PVR y menor índice cardíaco y demostraron menos vasoreactividad (3% vs. 12). Sin embargo, como los síntomas se desarrollan tarde en el curso de la enfermedad, aún hoy en día, el 70 % de los pacientes son diagnosticados en fases avanzadas, a pesar que la detección temprana es crucial. En este sentido, el estudio genético es una estrategia fundamental para el diagnóstico temprano y el manejo de la enfermedad, pero hasta ahora no se realiza en Argentina. En este contexto, el objetivo del

presente proyecto es desarrollar por primera vez en el país el estudio de mutaciones en el gen *BMPR2* en pacientes argentinos con diagnóstico de HAPH y HAPI confirmado por cateterismo derecho.

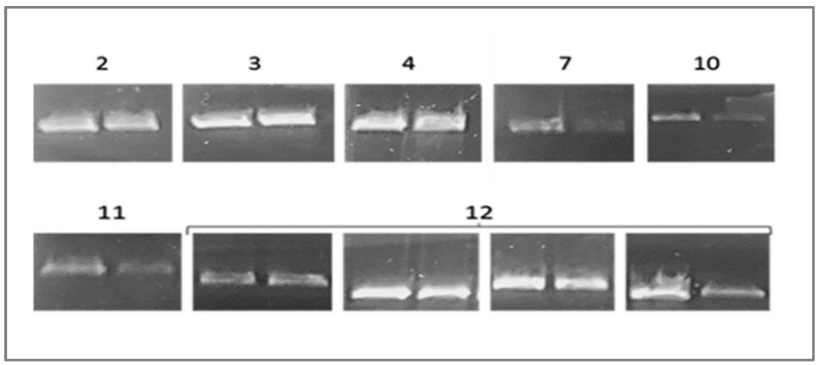
MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones estudiadas: Se reclutaron en total 14 pacientes provenientes del Hospital de Clínicas y la Fundación Favaloro. La edad mediaLas muestras de sangre periférica (SP) de los pacientes, anticoaguladas con EDTA (5%), fueron obtenidas por los médicos de dichas instituciones con el debido consentimiento informado. Además, se emplearon como controles normales 12 individuos sanos no relacionados, sin historia médica previa de cáncer, enfermedad respiratoria o cardíaca u otras patologías crónicas. El estudio cumple con la Declaración Internacional de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina.

Extracción de ADN: Las muestras de SP fueron sometidas a la lisis de glóbulos rojos con solución tampón de cloruro de amonio/bicarbonato de amonio (NH4Cl 0,014M /NH4HCO3 0,001M). La extracción del ADN se efectuó con DNAzol y se controló la calidad y cantidad del ADN extraido por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa (1%) teñidos con 0,25 ug/ml de bromuro de etidio (Br Et) a 80V durante 1 hora.

Estudio de mutaciones en el gen *BMPR2*: El análisis de mutaciones puntuales el gen *BMPR2* se efectuó amplificando 16 fragmentos, 1 por exón más 4 en el exón 12 debido a su mayor tamaño. Se usaron oligonucleótidos específicos reportados previamente (Deng et al., 2000). Los productos de PCR se controlaron por medio de electroforesis en geles de agarosa (2%) con BrEt (Figura 1).

Figura 1. Análisis de 10 exones en el gen *BMPR2*



Electroforesis en gel de agarosa (2%) mostrando los productos de PCR
de los exones 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12A, 12B, 12C y 12D.

Secuenciación directa: El producto de PCR se purifica a través de las columnas GFX PCR DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) y luego se cuantifica la concentración en gel de agarosa. La secuenciación directa de los productos de la PCR se llevó a cabo tanto en las cadenas de sentido como en las antisentido empleando los oligonucleótidos correspondientes para la amplificación de cada región de interés.

RESULTADOS

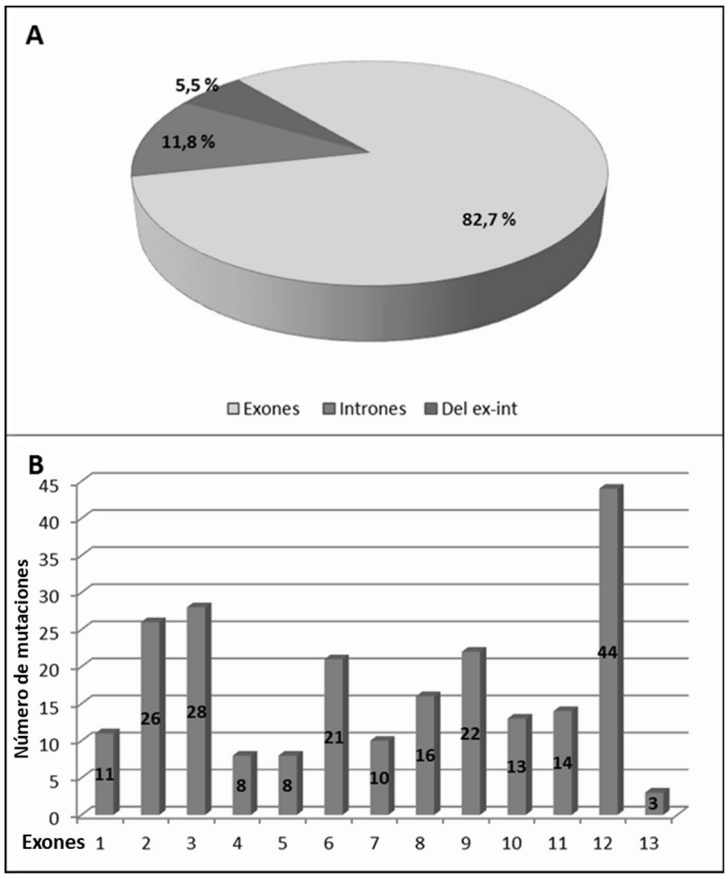
Se reclutaron en total 14 pacientes con diagnóstico de HAPI, de los cuales un solo caso estaba internado en el momento de la toma de muestra para el estudio genético. La mayoría estaba bajo tratamiento con: Sildenafil (10 casos), Diltiazem (2 casos) y Bosentan junto con Sildenafil (2 pacientes). En la siguiente tabla se muestran las características clínicas principales de los pacientes.

Características clínicas de los sujetos del estudio

	Pacientes con HAPI (n = 14)
Edad media (años)	49
Rango (años)	26-81
Sexo Fem/Masc	11/3
Clase Funcional	
I	2
II	10
III	2

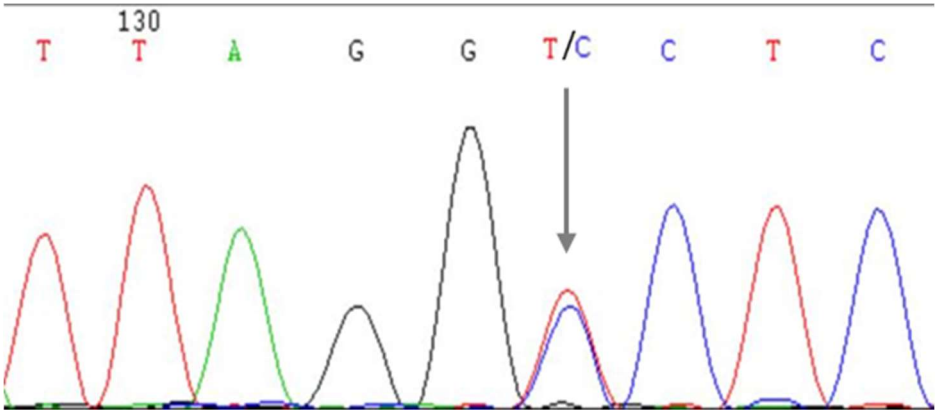
A fin de iniciar el estudio genético, en primer lugar, se analizó la distribución de las mutaciones en el gen *BMPR2* reportadas previamente con el objeto de conocer el perfil mutacional de los pacientes con HAP. Se empleó la base de datos disponible *online* de la Universidad de Utah (http://www.arup.utah.edu/database/ BMPR2/BMPR2_display.php). Para definir las regiones genómicas más involucradas se determinó la frecuencia de mutaciones y de deleciones reportadas en exones e intrones. Se estableció que la mayoría de las mutaciones (82,7%) se localizan en los exones, mientras que se encontraron pocas mutaciones en intrones (11,8%) y deleciones de exones e intrones (5,5%) (Figura 2A). El análisis de la frecuencia de mutaciones por exón reveló que los más afectados fueron los siguientes: 2, 3, 6, 9 y 12 aunque se identificaron distinto tipo de mutaciones en todos los exones (Figura 2B).

Figura 2. Análisis de las mutaciones reportadas en el gen BMPR2



A continuación, se realizó el estudio de mutaciones en la región codificante y en los límites intrón/exón del gen *BMPR2* en 8 pacientes y 4 controles. Para cada uno de ellos se amplificaron los 16 fragmentos y se procedió a realizar la secuenciación bidireccional de los productos de PCR. No se identificaron mutaciones en ninguno de los 13 exones de los 12 individuos estudiados. Dos pacientes presentaron un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), NM_001204: c.2811G>A (rs1061157) ubicado en el exón 12 del gen *BMPR2*. Este SNP genera un cambio del alelo de referencia G por el alelo de riesgo A. De modo que estos dos pacientes presentaron genotipo heterocigota *BMPR2* 2811-GA mientras que los demás individuos tenían genotipo homocigota *BMPR2* 2811-GG. En la Figura 3 se muestra la secuenciación de la cadena antisentido indicando la posición de la sustitución heterocigota T>C correspondiente, en la cadena complementaria, al SNP c.2811G>A.

Figura 3. Variante c.2811G>A ubicada en el exón 12 del gen *BMPR2*



La flecha gris señala la posición de la variante c.2811G>A

El análisis bioinformático del SNP c.2811G>A se realizó empleando las bases de datos disponibles online: *Ensembl* 2019 (http://grch37.ensembl.org/index.html) y *The Genome Aggregation Database* (https://gnomad.broadinstitute.org). Se demostró que este SNP es una variante de secuencia *sinónima* la cual no tiene ningún efecto sobre el aminoácido codificado, aunque se encuentra en la región codificante. Este SNP no produce un cambio de aminoácido ya que tanto el codón con el alelo G [AG**G**] como el que tiene el alelo variante [AG**A**] codifican para el aminoácido Arginina (p.Arg 937). El SNP c.2811G>A está asociado al fenotipo de hipertensión pulmonar y ha sido reportado en pacientes con HAP y en controles sanos previamente (Cogan, 2006; Wei, 2012; De Gottardi, 2012; Xi, 2016).

CONCLUSIONES

El presente proyecto permitió iniciar el estudio de mutaciones en el gen *BMPR2* en pacientes con HAP de Argentina para lo cual se pusieron a punto, por primera vez, las técnicas de PCR necesarias para analizar los 16 fragmentos correspondientes a la región codificante de la proteína y los límites intrón/exón del gen *BMPR2*. En nuestro conocimiento, este estudio hasta ahora no se realiza en otros laboratorios del país. En los pacientes estudiados no se detectaron mutaciones patogénicas en el gen *BMPR2* mientras 2 de los 8 casos exhibieron el polimorfismo c.2811G>A, el cual según nuestro análisis no tiene efecto en la patología. Al mismo tiempo, se detectó el SNP c.2811G>A mediante en dos pacientes, pero no se encontró ninguna correlación con la aparición de HAP por el análisis bioinformático. Debido a la naturaleza exploratoria de este estudio y a los elevados costos, el presente trabajo se limitó a los pacientes reclutados. Si bien es importante aumentar el tamaño de la muestra para definir el perfil mutacional de los pacientes argentinos, estos estudios proporcionan una base científica útil para el diagnóstico temprano, tratamiento, asesoramiento genético y pronóstico a largo plazo de la enfermedad en nuestro país.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by a sustained increase in pulmonary arterial pressure, right-sided heart failure and death. Genetic studies in patients with familial PAH (FPAH) and idiopathic PAH (IPAH) have identified heterozygous mutations in the bone morphogenetic protein type receptor II (*BMPR2*) gene. However, no genetic studies are still performed on PAH patients from Argentina. Therefore, the aim of this work was to set up, for the first time, the molecular study of BMPR2 mutations in our country. Genomic DNA was isolated from lymphocytes from14 patients with PAH and 12 healthy individuals. The protein-coding region and intron/exon boundaries of the *BMPR2* gene were amplified by PCR. Direct sequencing of PCR products was conducted on both the sense and antisense strands. No *BMPR2* mutations were found in patients nor in controls. Two patients presented a single nucleotide polymorphism (SNP), NM_001204: c.2811G>A (rs1061157) located in exon 12 of the *BMPR2* gene. This SNP generates a change of the reference G allele to the risk A allele. Bioinformatic analysis showed that this SNP is a synonymous sequence variant which has no effect on the encoded amino acid. Both, the codon with the G allele [AGG] and the one with the A allele [AGA] codify for the amino acid Arginine (p.Arg 937). The SNP c.2811G>A is associated with the pulmonary hypertension phenotype and has been previously reported in PAH patients and healthy individuals. Although it is importante to increase the sample size to define the mutational profile of Argentine patients, these studies provide a scientific basis usefull for early diagnosis, treatment, genetic counseling and long-term prognosis of the disease in our country.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, et al. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. Hum Mutat 27:212-3, 2006.
2. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, Stanton KC, Wheeler LA, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC. High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med 174:590-8, 2006.
3. De Gottardi A, Seijo S, Milá M, Alvarez MI, Bruguera M, Abraldes JG, Bosch J, García-Pagán JC. Bone morphogenetic protein receptor 2 in patients with idiopathic portal hypertension. J Cell Mol Med 16:2017-21, 2012.
4. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. Am J Hum Genet 67:737-44, 2000.
5. Ma L and Chung WK. The role of genetics in pulmonary arterial hypertension. J Pathol 241: 273-280, 2017.
6. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS). Eur Heart J 37:67-119, 2016.

7. Garcia-Rivas G, Jerjes-Sánchez C, Rodriguez D, et al. A systematic review of genetic mutations in pulmonary arterial hypertension. BMC Med Genet 18:82, 2017.
8. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. Am J Respir Crit Care Med 173:1023-30, 2006.
9. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol 54:S32-S42, 2009.
10. Mazzei JA, Cáneva J, Khoury M, Melero M. Mortalidad por hipertensión arterial pulmonar idiopática en la Argentina. Insuf Card 10:111-8, 2015.
11. Mazzei JA, Cáneva JO, Perrone SV, et al. Update in the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Medicina (B Aires) 71 Suppl 1:1-48, 2011.
12. Schleinitz D, Klöting N, Böttcher Y, Wolf S, Dietrich K, Tönjes A, Breitfeld J, Enigk B, Halbritter J, Körner A, Schön MR, Jenkner J, Tseng YH, Lohmann T, Dressler M, Stumvoll M, Blüher M, Kovacs P. Genetic and evolutionary analyses of the human bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2) in the pathophysiology of obesity. PLoS One 6:e16155, 2011.
13. Soubrier F, Chung WK, Machado R, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol 62(25 Suppl):D13–D21, 2013.
14. Wei M, Han B, Liu F, Wang L, Sun J. A Novel Mutation in BMPR2 in Patients with Congenital Heart Disease and Pulmonary Arterial Hypertension. J Clinic Experiment Cardiol 3:2, 2012.
15. Wong WK, Morse JH, Knowles JA. Evolutionary conservation and mutational spectrum of BMPR2 gene. Gene 368:84-93, 2006.
16. Xi Q, Liu Z, Zhao Z, Luo Q, Huang Z. High Frequency of Pulmonary Hypertension-Causing Gene Mutation in Chinese Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. PLoS One 11:e0147396, 2016.

ESTUDIO DE MARCADORES TUMORALES Y DEL MICROAMBIENTE POTENCIALMENTE ASOCIADOS A LA QUIMIORRESISTENCIA DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

Claudia Gentili, Ariel O. Zwenger, Horacio V. Maturi, Luis Gómez, Natalia Calvo, Graciela Gigola, María Julia Martín, María Belén Novoa Diaz, Pedro Matías Carriere

Laboratorio de Química Biológica - Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. INBIOSUR - CONICET - Universidad Nacional del Sur

PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA - ANTECEDENTES

En Argentina, el cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de muerte por enfermedad maligna según los datos aportados por el Instituto Nacional del Cáncer (https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2019-12/tamizaje-ccr-diagramada.pdf). Generalmente los pacientes presentan síntomas en estadios avanzados del CCR, que conlleva a fracaso de los tratamientos y recurrencia de la enfermedad. Sumado a esta problemática, muchas personas de los grupos de riesgo siguen aún sin acceder a las estrategias de prevención/detección temprana implementados por el Programa Nacional de Prevención y Detección Temprana del Cáncer Colorrectal del Ministerio de Salud. Con respecto a su tratamiento, la cirugía curativa es factible en un porcentaje de pacientes y otras estrategias incluyen la radioterapia y quimioterapia. Lamentablemente, una considerable cantidad de pacientes con CCR fracasan a estos esquemas de tratamiento debido a la quimiorresistencia (Martini et al., 2017; Xiong y Xiao, 2018). Dado este panorama, se necesita la identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz y/o con valor pronóstico/predictivo.

El microambiente del tumor suma cada vez más evidencias respecto a su importancia en la progresión del CCR y la quimiorresistencia (Wolff et al., 2019; Santos y Almeida, 2020). A través de citoquinas y otros mediadores, el estroma se comunica con las células tumorales influyendo en la proliferación, la apoptosis, la migración, la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la inducción del fenotipo de "cáncer stem cell" (CSC) (van Pelt et al., 2018; Hernández de la Cruz et al., 2020). Recientes hallazgos apuntan al programa TEM y a las CSC de CCR como eventos claves en el avance del cáncer y resistencia a la quimioterapia (Tsoumas et al., 2018). Una citoquina asociada al desarrollo tumoral es el péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP) que fue identificado inicialmente como el agente causal de hipercalcemia en pacientes con enfermedad oncológica avanzada; sin embargo actualmente se sabe que está involucrada en múltiples funciones fisiológicas. PTHrP actúa de manera paracrina y autocrina en prácticamente todos los tejidos (Naafs, 2017) aunque su acción paracrina es la más frecuente (McCauley y Martin, 2012); es además un factor bioactivo en la iniciación, el crecimiento y la invasión de varios carcinomas (Naafs, 2017). Esta citoquina está frecuentemente sobre-expresada en ausencia de hipercalcemia en cáncer de mama,

próstata, pulmón y de colon (Zhang et al 2019). En biopsias de pacientes con CCR se observó que PTHrP sobre-expresada se correlacionaría con factores pronósticos desfavorables de la enfermedad (Malakouti et al., 1996; Nishihara et al., 1999; Nishihara et al., 2007). Hasta el momento se desconoce qué efecto tiene PTHrP sobre la quimiorresistencia en pacientes con CCR.

Los resultados que se obtuvieron durante estos últimos 10 años por la labor realizada por el grupo de investigación revelan que PTHrP en las células Caco-2 y HCT116 (dos modelos celulares de CCR con distinto grado de diferenciación y agresividad que expresan el receptor de PTHrP denominado RPTH1) favorece la supervivencia, la progresión del ciclo celular, la proliferación y la migración mediante las vías de RSK, ERK1/2 MAPK, p38 MAPK, PI3K/Akt y β-catenina. PTHrP favorece además los siguientes eventos asociados a un comportamiento más agresivo: 1- Modula la expresión de Met, un receptor asociado a la progresión del CCR, de MMP-7 y SPARC, dos marcadores fuertemente implicados en la invasión tumoral, y de CD44 y CD24, ambos marcadores de CSC de CCR. 2- Favorece cambios morfológicos asociados a la TEM y modula la expresión de los siguientes marcadores de este programa: CK-18, E-cadherina, N-cadherina y ZEB-1. 3- Aumenta la expresión del factor pro-angiogénico VEGF que promueve la interacción de las células tumorales y las endoteliales favoreciendo la angiogénesis asociada al tumor. 4- Incrementa la quimiorresistencia a CPT-11 y Oxaliplatino (ambas drogas empleadas en el tratamiento de CCR) a través de las MAPKs, Met y β-catenina y aumenta la expresión del marcador de quimiorresistencia ABCG2. PTHrP también actúa directamente sobre las células endoteliales HMEC-1 del microambiente (que expresan RPTH1) favoreciendo la proliferación, la expresión de las citoquinas pro-tumorales TGFβ y SPARC con su consecuente secreción al medio condicionado (MC). El tratamiento de las células del CCR con los MCs de las células endoteliales (tratadas con PTHrP) disminuye la expresión de E-cadherina y favorece cambios morfológicos relacionados a TEM. Estos hallazgos sugieren que PTHrP modula el fenotipo agresivo de las células de CCR a través de su influencia sobre las células del microambiente.

En un modelo animal de CCR se observó que PTHrP modula la expresión de varios marcadores relacionados con eventos tumorigénicos tales como VEGF (marcador de angiogénesis), E-cadherina (marcador epitelial asociado a TEM), SPARC (marcador de invasión), CD44 y CD24 (marcadores de CSC de CCR) y Met (marcador de progresión de CCR).

Estos aportes al conocimiento de la biología del CCR han generado varios trabajos científicos (Lezcano et al., 2013; Calvo et al., 2014; Martin et al., 2014; Calvo et al., 2017; Martin et al., 2018; Calvo et al., 2019; Novoa Diaz et al., 2020; Carriere et al., 2021a; Carriere et al., 2021b; Novoa Diaz et al., 2021), impulsan a seguir investigando los mecanismos moleculares que conducen al comportamiento agresivo de células de CCR inducido por PTHrP y sientan además las bases para evaluar el valor pronóstico y/o predictivo de PTHrP y sus efectores en el CCR.

OBJETIVO GENERAL

En base a los avances del grupo de investigación se propuso realizar un estudio utilizando biopsias diagnósticas de pacientes con CCR con el fin de extrapolar los hallazgos obtenidos tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo*.

METODOLOGÍA-RESULTADOS

Para cumplir con el objetivo se cuenta con el banco de muestras de CCR del Hospital Interzonal de Graves y Agudos Dr. José Penna (Bahía Blanca) y con el banco de muestras de CCR del Hospital Provincial de Neuquén (se cuenta con los avales de los comités de ética de ambos Hospitales). También se cuenta con la experticia y asesoramiento del médico oncólogo Dr. Ariel Zwenger y del médico patólogo Luis Gómez (este último se incorporó al proyecto en el transcurso del 2018). Se destaca que en el periodo de duración del subsidio FUNDACION ROEMMERS (2018-2020) el Dr. Zwenger era Jefe del servicio de Oncología Clínica del Hospital Provincial de Neuquén mientras que el Dr. Gómez era Jefe del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Dr. José Penna.

Durante los primeros años del estudio (que coincidió con el periodo 2018-2020 del subsidio FUNDACION ROEMMERS) se priorizó el análisis de muestras de pacientes con CCR del Hospital Dr. José Penna dada la cercanía de este Hospital con las instalaciones de nuestros laboratorios de la UNS (Bahía Blanca). Se analizaron los datos de las historias clínicas (HC) de los pacientes con CCR que fueron atendidos durante los años 1990 a 2007. Como se mencionó en el primer informe, se logró analizar los datos de 94 HC de 94 pacientes que fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: ser mayor de 18 años, tener confirmación histológica de cáncer de colon o de recto y presentar cualquier estadio de la enfermedad.

Criterios de exclusión: los pacientes con antecedentes de enfermedad oncológica o evidencia de un tumor de otro origen al momento del diagnóstico de CCR, menores de 18 años, mujeres embarazadas o en período de lactancia. Teniendo en cuenta que el proyecto se basa en la evaluación de la resistencia frente a la quimioterapia, también se excluye pacientes diagnosticados que frente a la necesidad de quimioterapia hayan decidido no someterse al tratamiento luego de la resección quirúrgica y pacientes de los cuales no se ha tenido un seguimiento apropiado del tratamiento.

Se procedió a extraer la información relevante para nuestro estudio y organizarla en una planilla de cálculo del sistema Microsoft Excel.

Los datos de las HC incluyeron: fecha de admisión, género, edad, antecedente de cáncer familiar (padre, madre, hijo, hermanos, tíos), comorbilidades (diabetes mellitus, hipertensión arterial, úlcera, cardiopatía, alergias, operaciones), hábitos (tabaquismo, alcoholismo), ocupación, fecha del primer síntoma, fecha de la primera consulta, fecha del primer diagnóstico, fecha de la primera recurrencia, tipo de recurrencia, sitio primario tumoral (colon, recto), localización (colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoides), diagnóstico histopatológico, subtipo, grado histológico, grado nuclear, índice mitótico, invasión linfática, vascular y perineural, necrosis, número de ganglios resecados, número de ganglios positivos, estadío TNM-UICC (primary Tumor, regional lymph Node, distant Metastasis), estadío Dukes, datos personales (peso habitual, peso actual, talla, superficie corporal, índice de masa corporal), valoración funcional del paciente (medido con la escala de Karnofsky), tipo de cirugía primaria,

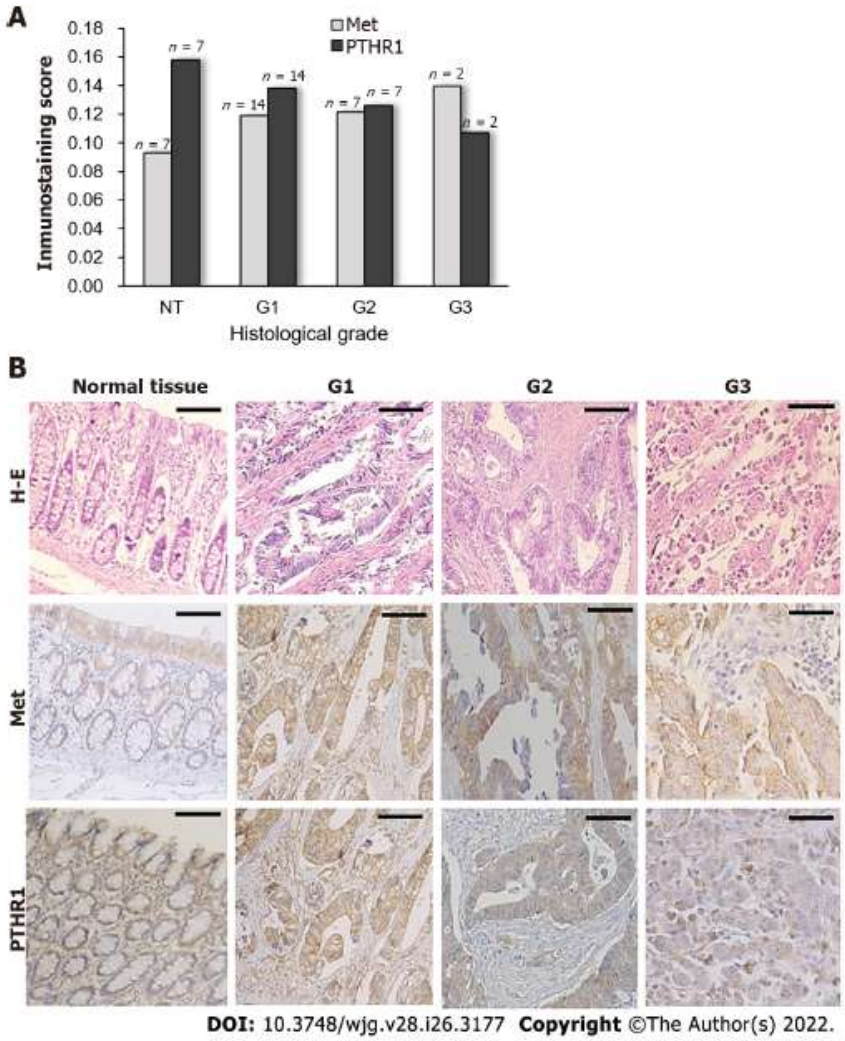
fecha de la primera cirugía, enfermedad residual, radioterapia adyuvante, quimioterapia (adyuvante, primera, segunda y tercera línea), fecha de último control, seguimiento (vive, perdido, fallecido), fechas de la primera, segunda o tercera progresión de la enfermedad y sitio metastásico, niveles de CEA y sialil Lewis a (CA19-9) pre- y post-quirúrgico.

A partir de este análisis, se logró extraer la información más relevante de 60 pacientes en estadio II o III de la enfermedad que permitió continuar con el estudio de los marcadores planteados en el proyecto. El criterio de seleccionar estos pacientes se basa en su tratamiento a partir de quimioterápicos y teniendo en cuenta que este proyecto se basa en el estudio de la quimiorresistencia de pacientes de CCR. Como se mencionó en los siguientes informes, seguidamente se planteó evaluar los marcadores de interés mediante la técnica inmunohistoquímica (IHQ) en las muestras tumorales de esos 60 pacientes obtenidas de la biopsia diagnóstica (muestras fijadas, deshidratadas y conservadas en tacos de parafina). Una dificultad que se encontró en este proyecto fue que las muestras de biopsias tumorales datan de al menos 12 años de antigüedad que conllevó de un gran esfuerzo de nuestra parte para acondicionar los tacos y de esta manera poder trabajar debidamente con ellos. De hecho, con las muestras de muchos pacientes fue imposible trabajar. Otra gran dificultad fue, como es de público conocimiento, que durante el 2020 en el contexto de la pandemia de COVID-19 y debido al aislamiento obligatorio en nuestro país, no pudimos acceder a los laboratorios de la Universidad Nacional del Sur para realizar nuestras actividades experimentales. En consecuencia, a partir de estas dos grandes limitaciones nuestro tamaño muestral fue de n=23, con lo que el estudio de IHQ durante el periodo 2018-2020 (informado en los siguientes informes) se pudo realizar sobre 23 pacientes de CCR, al que se les sumó 7 muestras normales de colon que se usaron de controles.

En primera instancia se realizaron cortes que fueron evaluados mediante tinción con hematoxilina-eosina. Luego, sobre los cortes de las muestras en portaobjetos silanizados se evaluaron mediante IHQ la expresión del RPTH1 (el receptor para PTHrP) y de Met. El criterio de evaluar la expresión del receptor de la citoquina es porque los cambios en la expresión de PTHrP y de su receptor se correlacionarían debido a la acción autócrina/parácrina de PTHrP. Por otro lado, se tuvo en cuenta dos criterios para incluir la evaluación de la expresión de Met: 1- debido a que se sabe que es un receptor con actividad tirosina quinasa (RTK) que se encuentra sobre-expresado entre el 30-70% de los CCR (Tamas et al., 2015) y que su vía de señalización participa de la inducción del fenotipo de CSC de CCR y del fenómeno de TEM ambos eventos que están asociados al fenotipo agresivo de células de CCR 2-como se mencionó en sección antecedentes, en nuestros modelos *in vitro* empleando líneas celulares de CCR hemos observado que PTHrP modula la expresión de Met y que la señalización de Met inducida por PTHrP está involucrada en eventos moleculares asociados al fenotipo agresivo de células derivadas de CCR; además, la administración de PTHrP en un modelo animal de CCR aumenta la expresión proteica de Met.

Como se observa en la **Figura 1A**, la expresión tanto de Met como de RPTH1 fueron analizadas en función del grado de diferenciación histológica de las biopsias y del estadío que cursa cada paciente la enfermedad; esto nos permitió correlacionar la intensidad y localización de la marca directamente con las características del tejido tumoral, resultado de interés en el caso de encontrarse una relación entre estos marcadores y la histopatología del tejido. El grado histológico se definió como muestras de pacientes con adenocarcinomas de colon bien diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) y escasamente diferenciado (G3).

Como se observa en la **Figura 1B**, a través del análisis observacional de las imágenes obtenidas por IHQ se destaca que en el tejido normal la marcación del receptor Met es homogénea en todo el citoplasma de la célula epitelial, mientras que en las células tumorales aumenta la intensidad de marcación en la membrana conforme disminuye el grado de diferenciación. Con respecto al receptor de PTHrP, la intensidad de marcación disminuye gradualmente con la disminución del grado de diferenciación histológica del tumor y el receptor parece reubicarse desde la membrana plasmática de la célula epitelial en G1 al citoplasma y la zona perinuclear en G3.



DOI: 10.3748/wjg.v28.i26.3177 **Copyright** ©The Author(s) 2022.

Figura 1. Relación de la intensidad de tinción de Met y del receptor de PTHrP (RPTH1) con la diferenciación histológica del tumor. A: Cuantificación de la inmunotinción por análisis de la densidad óptica utilizando el complemento FIJI del programa Image J. **B:** Imágenes representativas (200 ×) obtenidas por la tinción de hematoxilina-eosina y por la técnica de inmunohistoquímica realizada para Met y RPTH1 para tejido colorrectal normal y tejido colorrectal tumoral con grados histológicos G1, G2 y G3. Barra de escala: 10 μM. H-E: tinción con hematoxilina-eosina; Met: Receptor Met; NT: tejido normal; PTHR1: receptor tipo 1 de PTHrP. **Estas imágenes están publicadas en: Novoa Diaz MB et al., World J Gastroenterol (2022) 28(26): 3177-3200. URL:https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v28/i26/3177.htm**
DOI: https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v28.i26.3177

En base a estas observaciones, finalmente decidimos realizar un estudio estadístico con el fin de elucidar si existe una correlación entre la expresión de Met y RPTH1. El coeficiente de correlación entre la expresión de Met y RPTH1 se evaluó mediante el Test de Spearman. A partir de que los pacientes se agruparon según estadio TNM (II, III y IV) y grado histológico (G1 y G2-G3), se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación de la expresión de Met o RPTH1 con cada grupo. Este análisis estadístico se realizó utilizando el lenguaje de programación R versión 4.1.1. El valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. No se encontró correlación con significancia estadística entre las expresiones de ambos receptores en las muestras tumorales. Para estudiar si existe una asociación estadísticamente significativa entre los grupos antes mencionados y la tinción inmunohistoquímica de Met o RPTH1, dicotomizamos las muestras en niveles de expresión bajo, medio y alto de Met o RPTH1. Encontramos que en tumores menos diferenciados, la expresión de Met aumentó ($p = 0,035$), mientras que la expresión de RPTH1 fue estadísticamente menor ($p = 0,0496$). No se encontró una asociación estadísticamente significativa de Met o RPTH1 con los estadios TNM.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del estudio de biopsias de 23 pacientes con CCR en el período de ejecución del proyecto subsidiado por la FUNDACION ROEMMERS indican que la expresión del receptor de PTHrP, RPTH1, es más marcada en tumores bien diferenciados, mientras que Met muestra un comportamiento contrario encontrando un mayor nivel de expresión en tumores poco diferenciados.

Además el análisis estadístico sustenta la hipótesis que se construyó inicialmente respecto a que PTHrP ejercería su acción principalmente en los primeros estadios del desarrollo tumoral que podría estar determinando una expresión y activación aberrante de Met en estadios más avanzados. Esto condicionaría el éxito del tratamiento favoreciendo la quimiorresistencia.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En este momento estamos abocados a la búsqueda de otros marcadores de relevancia mediante el empleo de modelos celulares y animales de CCR. Nos estamos focalizando en marcadores de CSC de CCR y de la TEM. La identificación de estos marcadores en los modelos mencionados permitirá su estudio en las muestras humanas. Además estamos evaluando la expresión de RPTH1 y de Met en biopsias de más pacientes con CCR con

el fin de aumentar el tamaño muestral y dar más sustento al análisis estadístico. El hecho de planear investigar marcadores en muestras de pacientes con CCR que acudieron al Hospital Provincial de Neuquén y al Hospital Interzonal Dr. Penna de Bahía Blanca nos permitirá comparar los patrones de expresión de los marcadores en estudio entre muestras de distintas regiones de la Argentina. Pensamos que emplear muestras de dos hospitales de gran envergadura y alta concurrencia de pacientes podría tener impacto regional.

Esperamos que en un mediano plazo (5 años aproximadamente) nuestros estudios en muestras humanas aumenten el conocimiento de la biología del CCR y contribuyan a identificar biomarcadores que faciliten la predicción y pronóstico de los tumores colorrectales, así como a la identificación de marcadores asociados a mayor potencial metastatizante y resistencia a las terapias farmacológicas.

PRODUCCIÓN

Los resultados presentados en este informe fueron:

1- Presentados al siguiente Congreso:

IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. 9-15 Septiembre 2020. Congreso Virtual. "Rol de PTHrP y del receptor de MET en la modulación de eventos asociados al fenotipo agresivo de células derivadas de cáncer colorrectal". Autores: Novoa María Belén, Carriere Pedro, Martín Ma Julia, Calvo Natalia, Zwenger Ariel, Gigola Graciela, Gentili Claudia. **Este trabajo obtuvo una distinción en el Congreso SAB 2020.**

2- Están incluidos en el siguiente manuscrito de reciente publicación:

- Involvement of Met receptor pathway in the aggressive behavior of colorectal cancer cells induced by PTHrP. María B Novoa Díaz, Pedro Carriere, Graciela Gigola, Ariel O Zwenger, Natalia Calvo, Claudia Gentili. World J Gastroenterol (2022) 28(26): 3177-3200. URL:https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v28/i26/3177.htm
DOI: https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v28.i26.3177.

3- Además serán incluidos en el siguiente trabajo de tesis doctoral:

"Estudio de vías de señalización desencadenadas por el análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) involucradas en eventos que favorecen el comportamiento agresivo de células tumorales intestinales". A defender en 2023. Trabajo de Tesis de la Bioquímica María Belén Novoa Diaz. Directora: Dra. Claudia Gentili.

REFERENCIAS

- Calvo, N., Carriere, P., Martin, M. J., & Gentili, C. (2017). Journal of molecular endocrinology, 59(1), 13-27.
- Calvo, N., Carriere, P., Martín, M. J., Gigola, G., & Gentili, C. (2019). Molecular and cellular endocrinology, 483, 50-63.
- Calvo, N., Martín, M. J., de Boland, A. R., & Gentili, C. (2014). Biochemistry and Cell Biology, 92(4), 305-315.

- aCarriere P, Calvo N, Novoa Diaz MB, Riquelme A, Lopez F, Torres MJ, Alonso E, Gandini NA, Gigola G, Contreras HR, Gentili C. (2021). Molecular and cellular endocrinology 530:111253
- bCarriere P; Novoa Díaz M. B.; López-Moncada F; Zwenger A; Contreras H; Calvo N; Gentili C. (2021). Annals of Oncology, 32: S158.
- Hernández de la Cruz, O. N., López-González, J. S., García-Vázquez, R., Salinas-Vera, Y. M., Muñiz-Lino, M. A., Aguilar-Cazares, D., ... & Carlos-Reyes, Á. (2020). Frontiers in oncology, 9, 1419.
- Lezcano, V., Gentili, C., & de Boland, A. R. (2013). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1833(12), 2834-2843.
- Malakouti, S., Asadi, F. K., Kukreja, S. C., Abcarian, H. A., & Cintron, J. R. (1996). The American surgeon, 62(7), 540-4.
- Martín, M. J., Calvo, N., de Boland, A. R., & Gentili, C. (2014). Journal of cellular biochemistry, 115(12), 2133-2145
- Martín, M. J., Gigola, G., Zwenger, A., Carriquiriborde, M., Gentil, F., & Gentili, C. (2018). Molecular and cellular endocrinology, 478, 32-44.
- Martini, G., Troiani, T., Cardone, C., Vitiello, P., Sforza, V., Ciardiello, D., ... & Martinelli, E. (2017). World journal of gastroenterology, 23(26), 4675.
- McCauley, L. K., & Martin, T. J. (2012). Journal of Bone and Mineral Research, 27(6), 1231-1239.
- Naafs, M. A. B. (2017). Endocrinology and Metabolism International Journal, 5(00139), 10-15406.
- Nishihara, M., Ito, M., Tomioka, T., Ohtsuru, A., Taguchi, T., & Kanematsu, T. (1999). The Journal of pathology, 187(2), 217-222.
- Nishihara, M., Kanematsu, T., Taguchi, T., & Razzaque, M. S. (2007). Annals of the New York Academy of Sciences, 1117(1), 385-392.
- Novoa Díaz MB, Carriere P, Martín MJ, Calvo N, Gentili C. (2021). World Journal of Gastroenterology, 27(41): 7025-7040.
- Novoa Díaz, M. B., Zwenger, A. O., Carriere, P. M., Martin, M. J., Calvo, N., Gigola, G., & Gentili, C. (2020). Annals of Oncology, 31, S1230.
- Santos, P., & Almeida, F. (2020). Cells, 9(6), 1450.
- Tamas K, Walenkamp AM, de Vries EG, van Vugt MA, Beets-Tan RG, van Etten B, de Groot DJ, Hospers GA. (2015) 41(8): 671-9.
- Tsoumas, D., Nikou, S., Giannopoulou, E., Tsaniras, S. C., Sirinian, C., Maroulis, I., ... & Bravou, V. (2018). Cancer genomics & proteomics, 15(2), 127-141.
- van Pelt, G. W., Sandberg, T. P., Morreau, H., Gelderblom, H., van Krieken, J. H. J., Tollenaar, R. A., & Mesker, W. E. (2018). Histopathology, 73(2), 197-206.
- Wolff, C., Zoschke, C., Kalangi, S. K., Reddanna, P., & Schäfer-Korting, M. (2019). European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 142, 1-7.
- Xiong, S., Xiao, G., (2018). Exp. Ther. Med. 15(4):3751-58.

- Zhang, R., Li, J., Assaker, G., Camirand, A., Sabri, S., Karaplis, A. C., & Kremer, R. (2019). Human Cell Transformation, 161-178.

ABSTRACT

Study of tumor and microenvironment markers potentially associated with chemoresistance in patients with colorectal cancer.

Background

Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) plays a key role in the development and progression of many tumors. Also, Met receptor is involved in the development and evolution of colorectal cancer (CRC). We found in CRC cellular models that the binding of PTHrP to its receptor (PTHR1) activates events associated with an aggressive phenotype. *In vivo*, PTHrP modulates molecular markers expressions linked to tumor progression

Aim

Our proposal was to perform a study in CRC human samples to validate our *in vitro* and *in vivo* observations.

Methods

The protocol was authorized by the Ethical Committees of both, the Hospital Dr. José Penna (Buenos Aires) and the Hospital Provincial de Neuquén (Neuquén). Tumor tissue samples and clinical histories of 23 CRC patients were analyzed. 7 cases with normal colorectal tissues were assigned to control group. Tumor sections from each paraffin block were stained for immunohistochemical detection. Assuming that the changes in the expression of PTHrP and its receptor are directly correlated, we investigated the expression of PTHR1 and also of Met in biopsies of CRC patients.

Results

Comparing tumors more histologically differentiated respect to those less differentiated we found that the labeling intensity of Met and PTHR1 increases and diminishes, in a gradually manner, respectively ($p<0.05$).

Conclusion

These findings and the statistical analysis support the idea that PTHrP would exert its action mainly in the early stages of tumor development, which could be determining an aberrant expression and activation of Met in more advanced stages. This would condition the success of the treatment favoring chemoresistance. More translational studies are needed to determine the clinical relevance of our observations.

DETERMINACIÓN DE PUNTOS DE CORTE EPIDEMIOLÓGICOS DE *MALASSEZIA FURFUR*, *MALASSEZIA SYMPODIALIS* Y *MALASSEZIA GLOBOSA* FRENTE AL FLUCONAZOL, ITRACONAZOL, VORICONAZOL Y ANFOTERICINA B

Gustavo Giusiano, Florencia Rojas, María de los Ángeles Sosa, Wenceslao Latorre, Javier Mussin, Liliana Alegre

Departamento de Micología, Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste

RESUMEN

Malassezia son levaduras comunes en el microbioma de la piel humana. Bajo ciertas condiciones puede causar enfermedades, desde trastornos de la piel hasta infecciones sistémicas. En ausencia de puntos de corte clínicos (CB), los valores de corte epidemiológicos (ECV) son útiles para diferenciar aislamientos con resistencia adquirida o mutacional. El objetivo fue proponer ECV tentativos de *Malassezia furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa* para fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ), ketoconazol (KTZ) y anfotericina B (AMB). Se estudiaron 80 aislamientos de *M. furfur*, 50 *M. sympodialis* y 30 de *M. globosa*. Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) se determinaron mediante el método de microdilución en caldo modificado (CLSI). Los ECV se estimaron mediante el programa de software *ECOFFinder* y diluciones dobles más allá del modal. ITZ, KTZ y VCZ mostraron los MIC más bajos. FCZ y AMB mostraron las MIC más altas y los rangos más amplios. Para ITZ y KTZ, ambos ECV fueron iguales o el ECV modal fue mayor en una dilución. Para FCZ, AMB y VCZ, especialmente *M. furfur*, los ECV modales fueron inferiores a los valores obtenidos por método estadístico. Cuando la distribución de MIC es el único dato disponible, no se puede establecer el punto de corte, y el ECV es la única herramienta que podría proporcionar algunas pautas para el tratamiento. En general, los ECV obtenidos aquí por MIC modal fueron inferiores a los obtenidos por el método estadístico. En aquella combinación fármaco/especie en la que se observaron diferentes picos en la distribución de la CIM, la diferencia entre ambos ECV fue mayor, mostrando una población de levaduras heterogénea. Este es el primer estudio que proporciona datos de ECV de 160 levaduras Malassezia. Los ECV obtenidos permiten determinar si una cepa es o no un aislado de tipo salvaje. Aunque los ECV no se pueden utilizar como predictores de la respuesta clínica, la identificación de aislados de tipo no salvaje sugiere que es menos probable que responda a un agente antimicótico determinado. En ausencia de CB para las especies de *Malassezia*, las ECV pueden proporcionar datos útiles orientativos para el tratamiento.

ABSTRACT

Malassezia are common yeasts in human skin microbiome. Under certain conditions may cause disease from skin disorders to systemic infections. In the absence of clinical breakpoints (CB), epidemiological cutoff values (ECVs) are useful to differentiate isolates with acquired or mutational resistance. The aim was to propose tentative ECVs of Malassezia furfur, M. sympodialis, M. globosa for fluconazole (FCZ), itraconazole (ITZ), voriconazole (VCZ), ketoconazole (KTZ) and amphotericin B (AMB). Isolates including 80 M. furfur, 50 M. sympodialis and 30 M. globosa were tested. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by modified broth microdilution method (CLSI). ECVs were estimated by ECOFFinder software program and two-fold dilutions beyond the modal. ITZ, KTZ and VCZ showed the lowest MICs. The highest MIC and widest ranges were for FCZ, and AMB. For ITZ and KTZ, both ECVs were equal or modal ECV was greater in one dilution. For FCZ, AMB and VCZ, especially M. furfur, modal ECVs were lower than values obtained by statistical method. When MIC distribution is the only data available, the breakpoint cannot be established, and ECV is the only tool that could provide some guidelines for treatment. In general, the ECVs obtained here by the modal MIC were lower than those obtained by statistical method. In that drug/species combination in which different peaks were observed in the MIC distribution, difference between both ECV was greater, showing a heterogeneous yeasts population. This is the first study that provides ECV data of 160 Malassezia yeasts. The ECVs obtained allow to determine whether a strain is or is not a wild type isolates. Although ECVs cannot be used as predictors of clinical response, identification of non-wild-type isolates suggests that it may be less likely to respond to a given antifungal agent. In the absence of CBPs for *Malassezia* species, ECVs can provide useful data.

INTRODUCTION

Malassezia is the most common fungal genus of the healthy human skin microbiome.1 Under the influence of certain factors such as skin microenvironment changes and alterations in host defenses, these yeasts can become pathogenic causing from skin disorders to systemic infections in susceptible patients (2 –10). The genus *Malassezia* include 18 lipophilic species (11, 12). Due to the inability to synthesize fatty acids most of the species are lipid-dependent, requiring strict nutritional conditions but also, special temperature and incubation time for *in vitro* growth (13-15). These special features interfere with the application of the reference methods available for the antifungal susceptibility study of yeasts. Standarized methods are still not available to obtain *Malassezia* susceptibility data. Given these challenges, different studies adapting the available reference methodologies have been performed (16-22). The primary objective of susceptibility testing is to know if a microorganism tested is susceptible or resistant to one specific antimicrobial agent. Established by the standard setting organizations, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), clinical breakpoints (CB) are the best microbiological predictors of patient outcome with antifungal therapy. However, CBs are only available for some *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. against some antifungal agents (23,24). Controlled prospective and comparative clinical trials are not frequent in the case of pathogens like *Malassezia* species, so solid data on treatment efficacy cannot be compiled. Moreover, the strict growth requirements of these yeasts complicate susceptibility studies, making it difficult to establish clinical susceptibility breakpoints. In the absence

of CB, epidemiological cutoff values (ECVs) are useful values. The ECV is defined as the MIC that differentiate a population into isolates without any phenotypically expressed resistance mechanism (wild-type isolates) from those with acquired or mutational resistance (non wild-type isolates) (25 –27). The ECV constitutes a sensitive indicator of the emergence of strains with *in vitro* reduced susceptibility to a given agent. Over the last few years, ECVs have been established for several moulds and yeasts, including *Candida*, *Cryptococcus,* and *Aspergillus* species. The CLSI has described guidelines and listed CLSI ECVs, while the EUCAST published ECVs on their MIC distribution website when the data are of sufficient quality (28). EUCAST had also determined tentative ECVs for less common pathogens like *Fusarium* or *Saccharomyces* species. For *Malassezia* species, only a few publications have estimated the ECV using a limited number of isolates (20,21) The objective of this work was to propose tentative ECVs for each species –drug combination for *Malassezia furfur*, *M. sympodialis, M. globosa* and fluconazole, itraconazole, voriconazole, ketoconazole, and amphotericin B.

MATERIALS AND METHODS

A total of 160 isolates, 80 *M. furfur*, 50 *M. sympodialis,* and 30 *M. globosa* were tested. All isolates were obtained from individual human clinical specimens with different dermatological or systemic infections and maintained in mineral oil in the culture collection of the Mycology Department, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. The isolates studied were previously identified by polymerase chain reaction–restriction fragment length poly- morphisms (PCR-RFLP) (29). MICs were determined using a modified broth microdilution based on the reference CLSI M27-A4 methodology.30 In order to optimize these lipid-dependent yeasts growth, modifications included the use of higher inoculum size (1 McF) , different temperature (32°C) and incubation time (72 h) , and a supplemented base medium adding 1.8% glucose, 1% peptone, 0.5% ox. bile, 0.5% malt extract, 1% glycerol, 0.5% Tween 40, 0.05% Tween 80, and chloramphenicol, according to previous reports (19,22) Antifungals tested included amphotericin B (AMB; Sigma-Aldrich), fluconazole (FCZ; Pfizer), itraconazole (ITZ; Sigma-Aldrich), voriconazole (VCZ; Pfizer), and ketoconazole (KTZ; Sigma-Aldrich).

The ECV is the MIC value that defines the upper limit of the wild type distribution (28). Tentative ECVs were calculated by taking into account the MIC distribution, the modal and the inherent variability of the test, and were estimated by using (i) the freeware statistical program 'ECOFFinder', following the statistical methods described by Turnidge et al. (*s* ECV) (31) and, (ii) twofold dilutions beyond the modal MIC value, as reported by other authors (*m* ECV) (21,25). The ECV encompassed 95% of isolates of the MIC distribution. Two isolates, *C. parapsilosis* ATCC 22 019 and *C. krusei* ATCC 6258, were used as quality control (QC) strains as recommended by CLSI (2).

RESULTS

MIC values obtained for antifungal agent against *M. furfur*, *M. globosa,* and *M. sympodialis* are shown in Table 1. MIC distributions spanned eight or more dilutions for FCZ and AMB and at least four dilutions for the remaining drugs, except for KTZ against *M. globosa* that included three. More than one peak was observed for FCZ and VCZ

against *M. furfur.* The Table 2 describes values of range, mode, statistical ECV, modal ECV (μg/m) and the percentage of isolates for which the MIC was higher than the ECV. *Candida* QC strains were within expected MIC ranges for all drugs evaluated despite the modifications made to the method. Among the azoles, ITZ, KTZ, and VCZ showed the lowest MIC values for most of the isolates tested. The highest MIC values and widest MIC ranges were observed for FCZ (Table 1). AMB showed wide MIC ranges for the three species evaluated; moreover, 37.5% of *M. furfur* isolates displayed high MIC values 30/80 ≥8 μg/ml) . ITZ and KTZ were active drugs against most *Malassezia* isolates (mode, 0.03 μg/ml). Comparing ECVs determined by both methods, values were equal or *m* ECV were higher than one twofold dilution for ITZ, KTZ, and VCZ against the three species tested. However, greater deviation and higher *s* ECV were observed for FCZ, AMB, especially against *M. furfur*.

DISCUSSION

The treatment of *Malassezia*-related infections is usually a challenge. This is in part, due to the limited information avail- able concerning to the *in vitro* susceptibility of these yeasts.

Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeasts has not been standardized therefore the results obtained by different laboratories are not comparable or reproducible. When MIC distribution is the only data obtainable, the breakpoint cannot be established, and ECV is the only available tool that could provide some guidelines for treatment. Several methods have been used to determine ECV: estimated ECV have been calculated as twofold dilution step higher than the MIC 50, have been estimated as twofold dilution above the modal, or calculated by statistical methods (31-33).

Table 1. MIC distributions for fluconazole, ketoconazole, amphotericin B voriconazole and itraconazole against *M. furfur*, *M. globosa* and *M. sympodialis*.

		Minimal Concentration Inhibitory (µg/ml)														
	SPECIES	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,125**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	
FCZ	*Malassezia furfur*	*	*	*	2	1	2	9	8	20	9	6	11	9	3	**80**
	Malassezia sympodialis	*	*	*	5	6	6	12	8	7	4	1	1			**50**
	Malassezia globosa	*	*	*	3	4	5	5	3	3	6	1				**30**
KTZ	*Malassezia furfur*	10	36	15	8	7	2	2								**80**
	Malassezia sympodialis	14	22	7	6	1										**50**
	Malassezia globosa	7	18	5												**30**
AMB	*Malassezia furfur*	*				2	6	15	13	14	12	11	7	*	*	**80**
	Malassezia sympodialis	*			1	6	6	9	12	11	3	1	1	*	*	**50**
	Malassezia globosa	*		1	2	4	4	11	3	3	2			*	*	**30**
VCZ	*Malassezia furfur*		19	22	14	4	12	5	4				*	*	*	**80**
	Malassezia sympodialis	8	20	16	6								*	*	*	**50**
	Malassezia globosa	2	9	7	5	4	3						*	*	*	**30**
ITZ	*Malassezia furfur*	7	52	16	5								*	*	*	**80**
	Malassezia sympodialis	6	30	11	3								*	*	*	**50**
	Malassezia globosa	3	20	6	1								*	*	*	**30**

* Non tested; FCZ: fluconazole; KTZ: ketoconazole; AMB: amphotericin B; VCZ: voriconazole and ITZ: itraconazole.

Table 2. Range, mode, statistical ECV and modal ECV obtained for each drugs against *Malassezia* species tested and percentage refer to no wild type.

Species	Antifungal Agent	MIC (µg/ml) Range	Mode	*Statistical ECV (µg/ml) (%)	Modal ECV (µg/ml) (%)
Malassezia furfur (n=80)	Fluconazole	≤0.125-≥128	4	128 (0.0)	16 (28.7)
	Ketoconazole	≤0.015-1	0.03	0.063 (0.14)	0.125 (0.14)
	Itraconazole	≤0.03-0.125	0.03	0.063 (6.3)	0.125 (0.0)
	Voriconazole	≤0.03-2	0.06	1 (11.3)	0.25 (26.3)
	Amphotericin B	0.25-≥32	1	32 (0.0)	4 (37.5)
Malassezia sympodialis (n=50)	Fluconazole	≤0.125-32	1	8 (4.0)	4 (12.0)
	Ketoconazole	≤0.015-0.25	0.03	0.125 (2.0)	0.125 (2.0)
	Itraconazole	≤0.03-0.125	0.03	0.063 (6)	0.125 (0.0)
	Voriconazole	≤0.03-0.125	0.03	0.25 (0.0)	0.125 (0.0)
	Amphotericin B	0.125-≥32	2	8 (4.0)	8 (4.0)
Malassezia globosa (n=30)	Fluconazole	≤0.125-64	8	16 (0.0)	32 (0.0)
	Ketoconazole	≤0.015-0.25	0.03	0.063 (0.0)	0.125 (0.0)
	Itraconazole	≤0.015-0.25	0.03	0.063 (0.0)	0.125 (0.0)
	Voriconazole	≤0.03-0.5	0.03	0.5 (0.0)	0.125 (23.3)
	Amphotericin B	0.06-8	1	16 (0.0)	4 (6.7)

*ECV encompassed 95% of the results in the WT distribution.

But in general, ECV is not calculated for fastidious organisms like *Malassezia* species. In this study, we propose and compare tentative ECV for lipid-depended *Malassezia* yeasts obtained by two different methods. In general, the ECVs obtained here by the modal MIC were lower than those obtained by statistical method, although ECVs for ITZ and KTZ were quite similar for the three species tested. Considering sECV, *M. furfur,* and *M. sympodialis* presented the highest proportions of non-wild isolates against KTZ and ITZ. The small number of isolates at the high end of the distribution may cause that the ECV be set too low (25). The evaluation of a greater number of isolates and molecular studies of resistance could specify the value of the ECV of these drugs. For *M. sympodialis* and *M. globosa* ECV obtained were equal or different in one twofold dilution for all the drugs tested In contrast, sECV was three dilutions higher than mECV for AMB and FCZ against

M. furfur. Due to the lack of information about *Malassezia* spp. resistance, it is difficult to determine which method used defines better the ECV. The ECV depends on the heterogeneity of the MIC distribution. In that drug/species combination in which different peaks were observed in the MIC distribution, the difference between both ECV was greater, showing a heterogeneous yeast population (*M. furfur* against FCZ and AMB) . It has been observed that more than one peak in a MIC distribution may reflect that a significant proportion of the yeasts population are not wild-type isolates.34 In some *Candida* species, several azole resistance mechanisms often occur simultaneously, leading to different degrees of MIC elevations (34-36). Although the low azole susceptibility of *Malassezia* yeasts is a well-documented phenomenon, mechanisms involved in azole drug resistance are not well known (10,18-20,22). A study reported by Iatta et al. suggested that the drug efflux pumps might be involved in the defense mechanism of *Malassezia* yeasts against azole drugs (37). We considered that these drug efflux pumps might be involved as defense mechanism in the isolates evaluated that showed low susceptibility to azole drugs. On the other hand, a larger number of isolates as recommended by CLSI and EUCAST to generate more diverse MIC data, could improve these non- normal distributions. Different studies employing broth microdilution methodology had reported MIC data for AMB against *Malassezia* species (7,18,19,22,38). However in the reviewed bibliography, only one article estimated ECV for *M. furfur* and AMB.21 Similar to our results, Iatta et al. obtained high ECV values for *M. furfur*, even using different formulation of AMB (8 and 32 μg/ml) . They calculated ECV as two twofold dilutions above the media, as was done in this study. Although there was a slight difference between the ECV calculated in both studies (one twofold dilution), the proportion of non- wild type isolates was higher in this work. ECVs depend on the testing methodology used to generate the MIC values. Even though both studies used broth microdilution methodology, the culture media and the inoculum size were different. In order to obtain comparable results, it is imperative to establish a reference methodology setting guidelines for evaluating the antifungal susceptibility of these yeasts. Adopting 0.25 μg/ml ECV for VCZ proposed here, obtained for the statistical method, a significant proportion of *M. furfur* isolates would be considered as non-wild type strains (21.3%; *n* = 21) similar to the mECV obtained. Higher ECV values had been obtained by similar studies performed by Carfachia et al., also using a microdilution test based on the CLSI reference document (20). In this report, they evaluated the modal ECV, but unlike the results obtained here, they reported a number of non-wild type isolates much lower (1/60 for human blood and sterile site and 1/18 for human skin isolates).

Differences observed could be, in part, due to the limited number of strains evaluated. It is important to highlight that 89.5% of these *M. fur- fur* isolates showed FCZ MIC values equal or higher than 4 μg/ml. In addition, 100% of those who presented VCZ MIC 1 μg/ml also showed FCZ MIC ≥16 μg/ml (data not shown). This may suggest combined mechanisms of resistance in *M. furfur* isolates that gives them cross-resistance to azoles. Iatta et al., suggested that both types of azole efflux pump transporters might be involved in the resistance mechanisms against azoles in *Malassezia* cells, with MDR1/P glycoprotein active against FCZ and VCZ, and ABC transporters against VCZ, that would explains the high MIC obtained for both drugs (37).

Our findings evidence variable antifungal susceptibility for *M. furfur*, *M. sympodialis,* and *M. globosa* to FCZ, AMB, and VCZ but also, a wide intra-species variability that may suggest a combination of wild type strains and resistant mutants. If there are a significant number of resistant isolates in the population, then the ECV can encompass resistant non-wild type isolates (25). Antifungal susceptibility testing in a larger number

of yeasts and further investigations to detect and characterize resistance mechanisms in *Malassezia* species are required. Molecular studies will also allow validating ECVs estimated from phenotypic data. Likewise, the evaluation of the resistance mechanisms by molecular tools would avoid us the risk of testing a high percentage of resistance isolates that could impact in the MIC in which the ECV is established. In contrast, *Malassezia* species were highly susceptible to ITZ and KTZ, in agreement with that observed in previous investigations; (10,19,20,22) a low acquired resistance rate to these drugs was observed and they might be considered as optimal antifungal agents in the management of *Malassezia* infections (10,20). This is the first study that provides ECV data of 160 lipid- dependent yeasts *M. furfur*, *M. sympodialis,* and *M. globosa* obtained from human patients. The ECVs are useful in surveillance, to detect the emergence of reduced susceptibility to a given agent (32). The ECVs proposed aid in classification as to whether a strain is or is not a wild type isolate. Although ECVs cannot be used as predictors of clinical response, identification of non wild-type isolate suggests that it may be likely to response to a given antifungal agent (25). However, the high ECVs of the three species tested for FLZ, AMB, and VCZ were similar to those previously reported for *Candida* species which usually show intrinsic azole resistance and re- quire controlled therapeutic management (10,20). The evidence herein suggests that these drugs may presented low efficacy against these *Malassezia* species. In the absence of CB for *Malassezia* species, ECVs can provide useful data about these three more common species, and for the future development of species-specific CB for *Malassezia* genus. Following the CLSI criteria, it is required data from more than one laboratory to set epidemiological cutoff values. The data obtained here is based on MIC values obtained for one reference laboratory, therefore we proposed tentative ECVs for *M. furfur, M. sympodialis,* and *M. globosa.* Molecular characterization of the underlying resistance mechanisms and clinical evidence of the infection caused by these yeasts are needed. We considered this one step to establish future CB for *Malassezia* yeasts.

Yeasts like *Malassezia* species are considered as important emergent opportunistic pathogens and limited data about their antifungal susceptibilities determined the need of more investigations and collaborative studies. ECVs do not replace breakpoints, but they may be useful for guide the antifungal treatment, particularly for these species which there are not breakpoints available.

REFERENCES

1. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* 2013; 498: 367–370.
2. Cabañes FJ. *Malassezia* Yeasts: How Many Species Infect Humans and Animals? *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003892.
3. Boekhout T, Mayser P, Guého-Kellermann E, Velegraki A. *Malassezia* and the Skin, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010; .
4. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 106–41.
5. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 785–798.
6. Blaes AH, Cavert WP, Morrison VA. *Malassezia*: is it a pulmonary pathogen in the stem cell transplant population? *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 313–7.

7. Iatta R, Figueredo LA, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections. *J Med Microbiol* 2014; 63: 1467–73.
8. Theelen B, Cafarchia C, Gaitanis G, Bassukas ID, Boekhout T, Dawson TL. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Med Mycol* 2018; 56: S10–S25.
9. Aguirre C, Euliarte C, Finquelievich J, Sosa M, Giusiano G. Fungemia and interstitial lung compromise caused by *Malassezia* sympodialis in a pediatric patient. *Rev Iberoam Micol* 2015; 32: 118–121.
10. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 76–98.
11. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. *Malassezia* spp. Yeasts of Emerging Concern in Fungemia. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10:370.
12. Guillot J, Bond R. *Malassezia* Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10.
13. Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Latrofa MS, Otranto D. Advances in the identification of *Malassezia*. *Mol Cell Probes* 2011; 25: 1–7.
14. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 2007; 45: 287–303.
15. Shah A, Koticha A, Ubale M, Wanjare S, Mehta P, Khopkar U. Identification and speciation of *Malassezia* in patients clinically suspected of having pityriasis versicolor. *Indian J Dermatol* 2013; 58: 239.
16. Miranda KC, Araujo CR de, Costa CR, Passos XS, Fátima Lisboa Fernandes O de, Rosário Rodrigues Silva M do. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 281–4.
17. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. In Vitro Activities of Ketoconazole, Econazole, Miconazole, and Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil against *Malassezia* Species. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 467–469.
18. Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3589–93.
19. Rojas FD, Sosa MÁ, Fernández MS, Cattana ME, Córdoba SB, Giusiano GE. Antifungal susceptibility of *Malassezia* furfur, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. *Med Mycol* 2014; 52: 641–646.
20. Cafarchia C, Iatta R, Immediato D, Puttilli MR, Otranto D. Azole susceptibility of *Malassezia* pachydermatis and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. *Med Mycol* 2015; 53: 743–748.
21. Iatta R, Immediato D, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. In vitro activity of two amphotericin B formulations against *Malassezi*a furfur strains recovered from patients with bloodstream infections. *Med Mycol* 2015; 53: 269–274.
22. Rojas FD, Córdoba SB, Sosa MÁ, Zalazar LC, Fernández MS, Cattana ME, et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses* 2017; 60: 104–111.

23. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI M60, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

24. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 2nd ed. CLSI supplement M61. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

25. Lockhart SR, Ghannoum MA, Alexander BD. Establishment and Use of Epidemiological Cutoff Values for Molds and Yeasts by Use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 1262–1268.

26. Espinel-Ingroff A, John Turnidge. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol* 2016; 33: 63–75.

27. CLSI. Principles and Procedures for the Development of Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing, 1st Ed. CLSI M57. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

28. CLSI. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 3rd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

29. Sosa M de los A, Rojas F, Mangiaterra M, Giusiano G. Prevalencia de especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de dermatitis seborreica en pacientes de Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30: 239–242.

30. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; 4th ed. CLSI M27 A4, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2020.

31. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 418–425.

32. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole and Candida spp. as Determined by CLSI Broth Microdilution. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2040–2046.

33. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela J-L, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin Susceptibility Testing of Candida Species: Comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, Disk Diffusion, and Agar Dilution Methods with RPMI and IsoSensitest Media. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 426–439.

34. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for Candida auris and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:.

35. Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in Candida albicans orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2551–2555.

36. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 120–128.

37. Iatta R, Puttilli MR, Immediato D, Otranto D, Cafarchia C. The role of drug efflux pumps in *Malassezia* pachydermatis and *Malassezia* furfur defence against azoles. *Mycoses* 2017; 60: 178–182.

38. Marcon MJ, Durrell DE, Powell DA, Buesching WJ. In vitro activity of systemic antifungal agents against *Malassezia* furfur. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 951–953.

DETECCIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN EMBARAZADAS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA

Ana Ximena Kiguen, Cecilia Cuffini, Fernando Venezuela, Marcela Marramá, Jessica Mosmann, Patricia Estofan, Susana Ruiz

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

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia Papillomaviridae, un grupo diverso de virus que infectan la piel y el epitelio mucoso. (Bosch et al 1995). Se encuentran extendidos en la naturaleza, se caracterizan por ser epiteliotrópicos, especie específicos y estar asociados a lesiones de diferente magnitud. Actualmente se han identificado más de 120 tipos de VPH, 40 de los cuales infectan la región anogenital. Estos últimos fueron clasificados como: VPH de bajo riesgo (preferentemente VPH-BR 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) comúnmente presentes en las lesiones benignas (condilomas y lesiones intraepiteliales de bajo grado) y VPH de alto riesgo (VPH-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) los cuales bajo la forma de infección persistente pueden conducir al cáncer cuello uterino (CaCu), según la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, perteneciente a la OMS (Walboomers et al 1999). Así mismo tres genotipos fueron clasificados como probables carcinógenos o de riesgo intermedio (VPH 26, 53,66) (Muñoz et al 2003).

La infección genital por VPH, es principalmente una Infección de Transmisión Sexual (ITS); sin embargo, la existencia de otras vías de transmisión, tales como, material contaminado, la transmisión perinatal y congénita han sido descriptas. Se han especificado posibles vías de transmisión del VPH entre la madre y su bebé: durante el paso del recién nacido a través del canal de parto, por una infección ascendente después de la ruptura prematura de las membranas, por espermatozoides infectados en la fecundación, y por diseminación hematógena. (LaCour DE et al 2012), La presencia de VPH en el líquido amniótico, en las membranas fetales, en los aspirados nasofaríngeos de recién nacidos por cesárea y en la sangre del cordón umbilical sugieren que la infección por VPH ha sido intrauterina por vía transplacentaria (Syrjänen S et al 2010). Así mismo, algunos autores demostraron que el contacto digital-genital y oral-genital, pueden favorecer la transmisión del VPH. Por lo tanto, la infección por VPH puede ocurrir por diferentes vías, aun así, se ha establecido que la misma ocurre por el contacto íntimo con mucosa y/o piel infectada.

Los factores de riesgo asociados a la infección por VPH incluyen: múltiples parejas sexuales, antecedentes de otras ITS, multiparidad, hábito de fumar, inmunosupresión y edad temprana en la primera relación sexual, entre otros (J. Niyibizi et al 2017).

Un concepto común es que el estado de inmunosupresión en el embarazo causaría una infección más agresiva por VPH, no obstante, a la fecha no se ha mostrado evidencia que sugiera una historia natural diferente de la infección por VPH en el embarazo. Sin embargo, existen reportes que muestran una mayor frecuencia de infección por VPH en las mujeres embarazadas en comparación con las mujeres no gestantes; en nuestra región, no hay datos disponibles acerca de esta infección en la población de estudio (A. Cotton-Caballero et al 2017- M. McDonnold et al 2014).

Aún es controversial afirmar que el embarazo predispone a la infección por VPH o a la transformación maligna. Varios investigadores han propuesto que los cambios fisiológicos y hormonales en el embarazo pueden modular la función inmune que conduce a cambios en el comportamiento de la infección por VPH, sugiriendo que la susceptibilidad y la persistencia de la infección por VPH aumenta durante el embarazo y por tanto así la incidencia de papilomatosis respiratoria recurrente (PRR) y verrugas genitales en niños. La PRR se presenta como múltiples papilomas de células escamosas en las cuerdas vocales, seguido de la transmisión a las cuerdas falsas, la epiglotis y el área subglótica, y ocasionalmente localizada en la tráquea y en los bronquios; es una enfermedad que amenaza potencialmente la vida, ya que muestra una tendencia a crecer en tamaño y número de lesiones, que, aunque benignas, pueden causar obstrucción respiratoria total. Los síntomas incluyen ronquera, disnea crónica y tos. Se reportó que el promedio de duración de los síntomas antes del diagnóstico definitivo oscila en 13 meses (Tasca RA et al 2006).

Algunos autores han informado la detección del VPH en el tracto genital de las mujeres y en la mucosa oral sana de sus recién nacidos, pero la tasa de detección varía ampliamente entre ellos. Si bien la presencia de VPH en los bebés es un evento poco frecuente, un estudio informó que en los hijos de madres VPH-positivo la frecuencia de detección de este virus fue 5 veces superior que en los hijos de madres VPH-negativas, demostrando así una asociación estadísticamente significativa (Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, et al. Perinatal transmission of human papilomavirus DNA.
Virol J. 2009; 6:83. [PubMed: 19545396].

Por todo lo antes descripto, es que consideramos de sumo interés aportar datos sobre la circulación de los diferentes genotipos de VPH en las mujeres embarazadas a fin de compararlos con los datos bibliográficos de la población femenina no gestante.

Objetivo General

Determinar la circulación de VPH y sus genotipos, en mujeres embarazadas en dos centros de salud de la Ciudad de Córdoba.

Objetivos Específicos

1- Determinar la presencia de VPH en mujeres embarazadas a fin de confirmar el diagnóstico.

2- Analizar los genotipos de VPH presentes en esta población con el objetivo de aportar datos para la formulación de futuras vacunas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población: La población de estudio estuvo constituida por pacientes mayores de 18 años de edad, embarazadas entre la semana 35-37 de gestación, que concurrieron a la Dirección de Especialidades Médicas Centro (DEMC) de la Municipalidad de la ciudad de Córdoba a realizarse control de *Streptococcus agalactiae* y pacientes, con las mismas características que las anteriores, que concurrieron al laboratorio de Análisis Clínicos Especializados LACE S.A..

Obtención de la muestra y detección de VPH: La muestra consistió en un hisopado del fondo de saco vaginal. La misma fue obtenida por profesionales de los establecimientos mencionados y posteriormente enviadas al Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" en un medio de transporte PBS (buffer fosfato) para la detección del VPH.

Tipo de muestreo: El muestreo fue de tipo aleatorio simple.

Tamaño muestral: Se tomaron 424 muestras. Este tamaño muestral se calculó utilizando el programa informático Epi Info 7.1.3.10 tomando como población total n=25160, el cual hace referencia a promedio de nacidos vivos en el departamento Capital de la provincia de Córdoba desde 2008 a 2012 (dado que no se hallaron datos del total de embarazo anuales), según la Dirección General de Estadísticas y Censos de la Provincia de Córdoba; una prevalencia de VPH esperada del 20% en embarazadas, con un intervalo de confianza del 95% y un 5% de precisión

Extracción de ADN: La extracción de ADN de las muestras se realizó utilizando el método de extracción comercial AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Inc., CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) VPH: una vez obtenido el ADN viral se procedió a la realización de una PCR genérica utilizando los "primers" degenerados: MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3) y MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3) dirigidos al gen L1, que codifica para la proteína mayor de cápside antigénica, de nombre homónimo. El tamaño del producto de amplificación fue de 450 pares de bases (bp). Los detalles del protocolo fueron publicados por Bernard 1994 y optimizado por Venezuela y col.

Visualización de los productos de PCR: Los productos de PCR se visualizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% utilizando un transiluminador de ondas UV. El gen de la β-globina fue utilizado como un marcador de preservación del ADN.

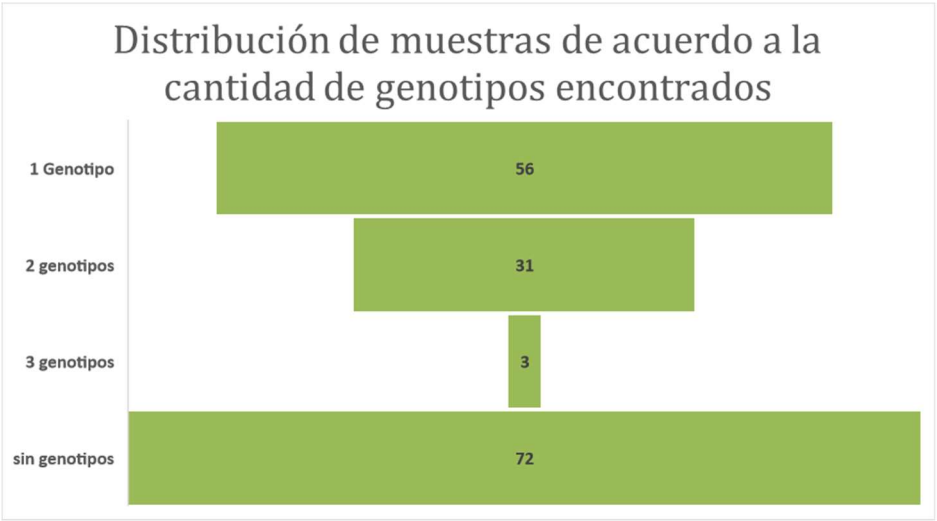
Genotipificación: las muestras positivas para la detección del ADN de VPH fueron sometidas al Análisis de los Polimorfismos de los Fragmentos de Restricción (RFLP) de acuerdo con la técnica de Bernard et al., 1994, en la cual una alícuota del producto obtenido en la PCR MY09-MY11, se mezcló con siete diferentes enzimas de restricción (Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I y Sau III). La visualización del producto se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 3,0 % utilizando un transiluminador de ondas UV.

RESULTADOS

De las 424 muestras analizadas, 162 resultaron positivas para la proteína L1 de VPH (38,2%), 249 resultaron negativas (58.7%) (38,2% vs 58,7% = p< 0,0001) y 13 muestras no fueron aptas para su análisis (3.1%).



Del total de muestras positivas, se pudieron genotipificar 90 muestras; ya que 72 de las mismas no resultaron aptas para hacer RFLP.
De las 90 muestras genotipificadas, encontramos 56 que tenían un solo genotipo, 31 de ellas tenían dos genotipos y 3 tenían 3 genotipos diferentes.



Con respecto a los genotipos encontrados, el más prevalente fue el 16, estando en el 50% (n=45) de las muestras genotipificadas ya sea solo o acompañado de otros genotipos. Le siguen en orden de prevalencia el genotipo 6 (40%, n= 36), genotipo 11 (14,5%, n=13), genotipo 31 (7,7%, n=7), genotipo 81 (5,5%, n=5). Otros genotipos encontrados son 18, 33, 42, 54, 57, 61, 62 y 67.

Genotipos	Monoinfección	Coinfección de 2 genotipos	Coinfección de 3 genotipos
6	14	19	3
11	8	4	1
16	20	25	3
18	3	1	1
31	4	3	0
33	1	0	0
42	1	0	0
52	0	1	0
54	0	0	1
56	0	1	0
57	0	1	0
58	0	3	0
61	1	1	0
62	1	1	0
67	0	1	0
81	5	0	0

Tabla 1: Distribución de genotipos encontrados de acuerdo a su hallazgo en monoinfección o coinfección de dos o tres genotipos

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Pandey et al en 2019 en India, ya que ellos tuvieron una prevalencia de 39,2% de infección por VPH en mujeres embarazadas.

Con respecto a los genotipos encontrados, es interesante que, en todas las coinfecciones de dos o tres genotipos, siempre encontramos algún genotipo de alto riesgo, al igual que Pandey.

Con estos resultados podríamos decir que las mujeres embarazadas tendrían un mayor riesgo de tener infección por VPH.

Estos resultados, sumados al conocimiento existente acerca de las consecuencias que puede traer esta infección, tanto en embarazadas como en niños, justificarían el seguir estudiando esta infección en diferentes poblaciones para así aportar información para la formulación de vacunas y la realización de políticas de estado tendientes a la prevención de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. 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. 1994 Nov;170(5):1077-85. doi: 10.1093/infdis/170.5.1077. Erratum in: J Infect Dis 1996 Feb;173(2):516. PMID: 7963696.

Bosch F-X, Manos M-M, Muñoz N, Et Al. International biological study on cervical cancer (IBSCC). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. Internacional Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 796-802.

Cotton-Caballero A, Dudley D, J. Ferguson, K. Pettit, and A. Boyle, "Maternal human papillomavirus infection increases the risk of premature rupture of membranes," Obstetrics & Gynecology, vol. 129, 2017.

LaCour DE, Trimble C. Human papillomavirus in infants: transmission, prevalence, and persistence. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2012 Apr;25(2):93-97. doi: 10.1016/j.jpag.2011.03.001. Epub 2011 May 20. PMID: 21600804; PMCID: PMC3632362.

M. McDonnold, H. Dunn, A. Hester et al., "High risk human papillomavirus at entry to prenatal care and risk of preeclampsia," American Journal of Obstetrics & Gynecology, vol. 210, no. 2, pp. 138.e1–138.e5, 2014.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641. PMID: 12571259.

J. Niyibizi, N. Zanr´e, M.-H. Mayrand, and H. Trottier, "The association between adverse pregnancy outcomes andmaternal human papillomavirus infection:A systematic reviewprotocol," *Systematic Reviews*, vol. 6, no. 1, 2017.

Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, et al. Perinatal transmission of human papilomavirus DNA. Virol J. 2009; 6:83. [PubMed: 19545396]

Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. APMIS. 2010; 118:494. [PubMed: 20553530]

Tasca RA, Clarke RW. Recurrent respiratory papillomatosis. Arch Dis Child. 2006 Aug;91(8):689-91. doi: 10.1136/adc.2005.090514. PMID: 16861486; PMCID: PMC2083023.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F. PMID: 10451482.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) belongs to the Papillomaviridae family, a diverse group of viruses that infect the skin and mucosal epithelium. Genital HPV infection is mainly a Sexually Transmitted Infection (STI); however, the existence of other routes of transmission, such as contaminated material, perinatal and congenital transmission, have been described. Possible routes of transmission of HPV between the mother and her baby have been specified: during the passage of the newborn through the birth canal, by ascending infection after premature rupture of the membranes, by infected sperm at fertilization, and by hematogenous spread.

The aim of our study was to detect the presence of human papillomavirus. in a population of pregnant women in the city of Cordoba, Argentina.

For do that, 424 samples they were taken from pregnant women, the DNA was extracted and subsequently were performed molecular biology techniques: PCR and RFLP for genotyping.

The total prevalence in this population was 38,2% and the most prevalent genotype was 16.

With these results we could say that pregnant women would have a higher risk of having HPV infection.

These results, added to the existing knowledge about the consequences that this infection can bring, both in pregnant women and in children, would justify continuing to study this infection in different populations in order to provide information for the formulation of vaccines and the implementation of state policies aimed at to its prevention

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

Vivian Labovsky [1] , Leonardo Dandeu [1], Sofia Sidlik [1], Alberto Penas-Steinhardt[1], Joel Lachovski [1], Pablo Marenco [1], María del Pilar Carballo [2], M. F. Alsina [3], Martín P. Vázquez [3], Alejandra Wernicke [3], Norma A. Chasseing [1]

[1] Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) – CONICET.
[2] Universidad Nacional de Luján. [3] Departamento de Patología - Hospital Italiano. [4] Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.
[5] Instituto Héritas (CIBIC – INDEAR)

RESUMEN

La composición del microbioma refleja las variables genéticas y aquellas asociadas al estilo de vida del huésped, cuya disbiosis aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Pacientes de diversos países presentan perfiles microbianos diferentes, lo que nos motivó a analizar el microbioma asociado a cáncer de mama de pacientes provenientes de Argentina. Para estudiar la relevancia pronóstica del microbioma en la evolución del cáncer de mama temprano, se realizó un estudio que incluyó biopsias de tejido tumoral mamario congelado/frescos (Hospital Roffo, N=7 y Hospital Italiano, N=1, respectivamente). Los criterios de inclusión fueron: mujeres con carcinoma ductal infiltrante, estadio clínico-patológico I/II, con un seguimiento mínimo de 5 años. Los criterios de exclusión fueron: pacientes con tratamientos previos, enfermedad inmune subyacente u otro tumor previo. El perfil bacteriano extraído de las muestras fue identificado estudiando las regiones hipervariables V3-V4 y V4-V4 del gen ARNr 16S. Se llevó a cabo la clasificación OTU y el análisis de diversidad alfa y beta, con el fin de estudiar posible asociaciones con parámetros como edad, tamaño tumoral, grado histológico, Ki-67, Her2/neu, ER, PR, ganglios linfáticos axilares y evolución tumoral. El análisis taxonómico de estas muestras indicó que Firmicutes (34,6%) y Proteobacteria (30,8%) son los filos más representativos. Observamos que la muestra del Hospital Italiano presentó mayor diversidad (OTUs) que las del Hospital Roffo. El análisis de diversidad alfa mostró una diferencia significativa entre el tamaño tumoral, mostrando una disminución en la diversidad con el aumento del tamaño tumoral (p value <0,0001, 't-test' de dos colas). Para concluir, podemos decir que el análisis de diferentes poblaciones bacterianas entre pacientes con diferente tamaño tumoral, abre nuevos caminos en el desarrollo de terapias alternativas para mejorar la calidad de vida de las pacientes.

Palabras claves: cáncer de mama, microbioma.

OJETIVO GENERAL

Estudiar la relevancia pronóstica del microbioma en la evolución del cáncer de mama temprano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Encontrar nuevos biomarcadores dentro del perfil bacteriano del tejido tumoral mamario (de buen o mal pronóstico), en los estadíos clínico-patológicos tempranos del cáncer de mama, que permitan pronosticar la evolución del tumor primario y la aparición de futuras metástasis.
2) Encontrar nuevos biomarcadores al estudiar funciones hipotéticas de las vías metabólicas y el potencial de virulencia a partir del ADN bacteriano aislado en el objetivo 1, que permitan agregar otro enfoque funcional a la evolución tumoral y la aparición de futuras metástasis.

INTRODUCCIÓN

En el cuerpo humano habitan una gran colección de bacterias, denominadas microbiota, que tienen tanto propiedades beneficiosas como perjudiciales para la salud (Urbaniak et al. 2014; 2016). Por esta razón comenzó hace algunos años un fuerte impulso para caracterizar aquellas bacterias que habitan en distintas partes del cuerpo y que alteran la salud. Así, se ha observado que los cambios en el microbioma podrían promover la progresión de distintas enfermedades, como ocurre con la enfermedad inflamatoria intestinal (Frank et al. 2007), psoriasis (Gao et al. 2008), asma (Hilty et al. 2010), diabetes (Larsen et al. 2010), cáncer colorrectal (Mira-Pascual et al. 2014), entre otras, donde se observó diferencias en el microbioma en comparación con los individuos sanos. Por el momento el hecho de detectar microbiomas alterados no implica tener un diagnóstico clínico, pero no está muy lejos el momento en el que el médico pida un diagnóstico de microbioma y en base a eso nos recete un probiótico de diseño, que vayamos a la farmacia a buscarlo y que lo tomemos para reconstituir determinado desorden en nuestro microbioma.

Recientemente, se ha demostrado la existencia de microbioma dentro del tejido mamario. Más aún, encontraron que las pacientes con cáncer de mama de Canadá e Irlanda, a pesar de tener como filo principal ***Proteobacteria***, presentaban una composición de bacterias diferente. Este resultado establece la necesidad de evaluar el microbioma en pacientes con cáncer de mama a nivel local, ya que los resultados obtenidos por otros países no podrán ser utilizados en su totalidad para inferir sobre la población de mujeres argentinas, tal como lo muestra el estudio de Urbaniak (Urbaniak *et al.* 2014; 2016) y el estudio de Mueller (Mueller *et al.* 2006). Además, se espera que el microbioma del microambiente del tejido tumoral mamario, presente algunas bacterias y funciones asociadas con parámetros de buen pronóstico, pero otras asociadas a mala evolución tumoral.

De este nuevo hallazgo, podrían surgir nuevos biomarcadores de buen y mal pronóstico asociados con la evolución tumoral de la paciente, dando la posibilidad de desarrollar una nueva terapia alternativas con “probióticos” que mejoren la calidad de vida de la paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 1 muestra de tejido tumoral mamario fresco del Hospital Italiano y 7 muestras de tejido tumoral mamario congelado (Banco de Tejido Congelado) del Hospital Roffo. Los criterios de inclusión fueron: mujeres con carcinoma ductal infiltrante, estadio clínico-patológico I/II, con un seguimiento mínimo de 5 años. Los criterios de exclusión fueron: pacientes con tratamientos previos, enfermedad inmune subyacente u otro tumor previo.

Extracción de ADN genómico total.

Se utilizó el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 51306) según indicaciones del fabricante.

Cuantificación e integridad del ADN genómico.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el equipo de NanoDrop (Espectrofotómetro NanoDrop TM 2000). Para ello se utilizó 1 ul de cada muestra.

La integridad se evaluó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, sembrando 300 ng del ADN obtenido de cada muestra con un marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen^{TM}, 10787018).

Amplificación del gen 16S con los primers V3-V4 y V4-V4.

Se amplificaron las secuencias del microbioma con los *primers* V3-V4 (506 pb) y V4-V4 (359 pb). Luego se extrajo el ADN amplificado del gel utilizando el kit EasyPure® Quick Gel Extraction Kit (Transbiotech, EG101). Las muestras fueron enviadas a Héritas de Rosario y se secuenciaron según el protocolo de Illumina.

Análisis de la diversidad del microbioma.

El secuenciador MiSeq-Illumina realizó 200.000 lecturas promedio por muestra para la identificación taxonómica. El recorte de las lecturas de baja calidad y la demultiplexación se realizó utilizando Trimmomatic v0.32. Las secuencias se analizaron mediante el software QIIME2 para la identificación de variantes de secuencia de amplicón (ASV), su posterior asignación taxonómica y el análisis estadístico. Las secuencias obtenidas fueron remitidas a la base de datos SRA de NCBI. De esta manera obtuvimos la clasificación OTUs (unidades taxonómicas operativas) observadas: donde se estudió la diversidad del microbioma utilizando el análisis de diversidad alpha basado en la de secuencias OTUs entre las muestras. Además, se procedió a estudiar si las comunidades microbianas en diferentes muestras son significativamente diferentes en su diversidad alfa en relación con los parámetros clásicos del cáncer de mama mediante el índice de Shannon. Asimismo, se determinó diferencias en su diversidad beta (diferencias en la composición bacteriana) entre las muestras y los parámetros clásicos del cáncer de mama, mediante el Análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinates Analysis, PCoA), mediante el algoritmo Unifrac. Los análisis estadísticos complementarios se llevaron a cabo con el programa R Studio v1.2.5001 considerando $p<0,05$ como estadísticamente significativo. Se empleó la corrección de Bonferroni cuando se realizaron múltiples comparaciones entre los grupos de individuos.

Estudio de las funciones hipotéticas de las vías metabólicas del microbioma encontrado.

Para investigar si los microorganismos presentes en el tejido tumoral mamario tienen una actividad metabólica pro-tumoral o no, examinamos si la función microbiana y la composición enzimática se asocian a diferentes vías metabólicas utilizando una base de datos bioinformática KEGG (Burns *et al.* 2015a; Lehouritis *et al.* 2015; Chan *et al.* 2016b). Además, se utilizó PICRUST, una herramienta diseñada para predecir contenido metagenómico funcional de un gen marcador o genomas completos.

RESULTADOS

Obtuvimos el ADN genómico de las muestras y evaluamos su integridad (Figura 1).

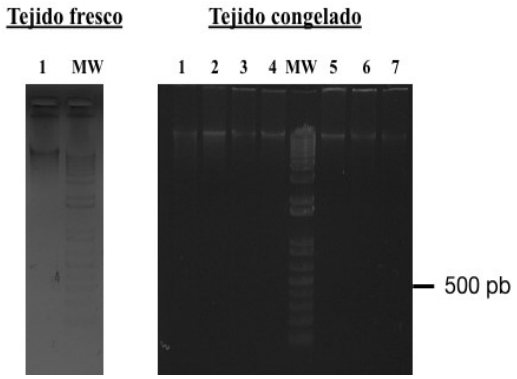


Figura 1. Determinación de la integridad del ADN genómico obtenido de 1 muestra de tejido tumoral mamario fresco (Hospital Italiano) y 7 muestras de tejido tumoral mamario congelado. MW: Marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder). Gel de agarosa al 1%.

Amplificamos la secuencia del gen ARNr 16S de las muestras utilizando los *primers* de las regiones V3-V4 (1 muestra de tejido tumoral mamario fresco de Hospital Italiano y 4 muestras de tejido tumoral mamario congelado del Hospital Roffo, **Figura 2**) o las regiones V4-V4 (3 muestras de tejido tumoral mamario congelado del Hospital Roffo, **Figura 3**).

Como se observa en la **Figura 2**, el Gel 1 muestras el tejido congelado sembrado por duplicado (1- 4'), X: calle sin sembrar, C+: ADN de E. coli y el C-: Sin ADN. En Gel 2, se sembró en la calle 1: 1 muestra tejido fresco, C+ y C-.

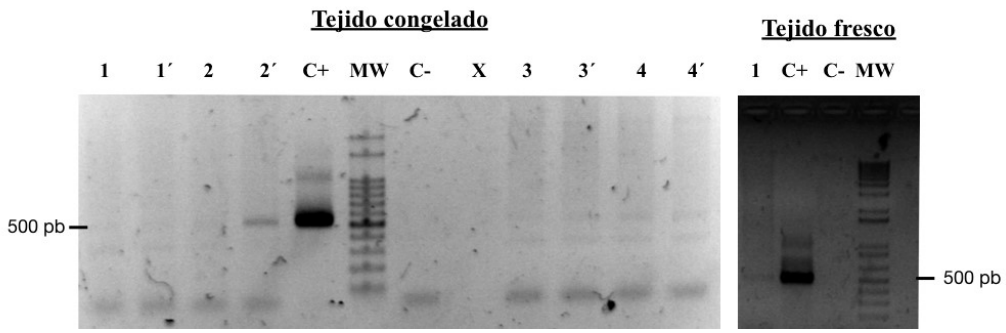
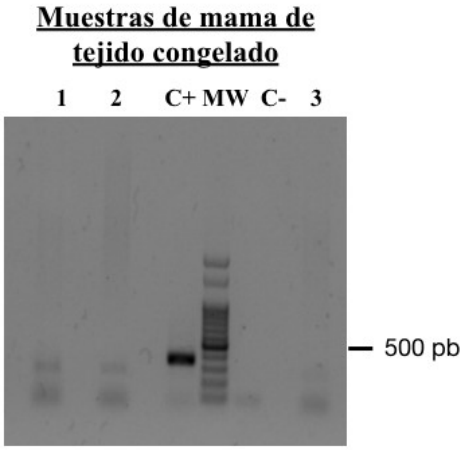


Figura 2. Muestra el producto de amplificación obtenido utilizando los *primers* V3-V4 (506 pb). MW: Marcador de peso molecular (PB-L Productos Bio-Lógicos, MA0202). Gel de agarosa al 1%.



La **Figura 3**, muestra el producto amplificado de 3 muestras con los *primers* V4-V4.

Figura 3. Muestra el producto de amplificación obtenido utilizando los *primers* V4-V4 (358 pb). MW: Marcador de peso molecular (PB-L Productos Bio-Lógicos, MA0202). Gel de agarosa al 1%.

Clasificación OTU (unidad taxonómica operativa).

A continuación, se muestra el gráfico de barras con la abundancia relativa de los grupos taxonómicos obtenido en cada muestra (1-9) desde su clasificación en Filo hasta Género **(Figura 4)** y el índice de Diversidad Chao 1, estima el número de especies (OTUs) en una comunidad basado en el número de especies raras de la muestras (**Figura 5)**.

En nuestras muestra encontramos como Filo principal ***Firmicutes*** y ***Proteobacteria*** y como Clase a ***Bacilli*** y ***Clostridia*** (dentro de ***Firmicutes***) y ***Alphaproteobacteria***, ***Betaproteobacteria*** y ***Gammaproteobacteria*** (dentro de ***Proteobacteria***). Pero también encontramos 2 filos más que tienen un porcentaje bastante elevado, ellos son ***Actinobacteria*** y ***Bacteroidetes***, con ***Actinobacteria*** como clase dentro de ***Actinobacteria***, y ***Bacteroidia*** dentro de ***Bacteroidetes.***

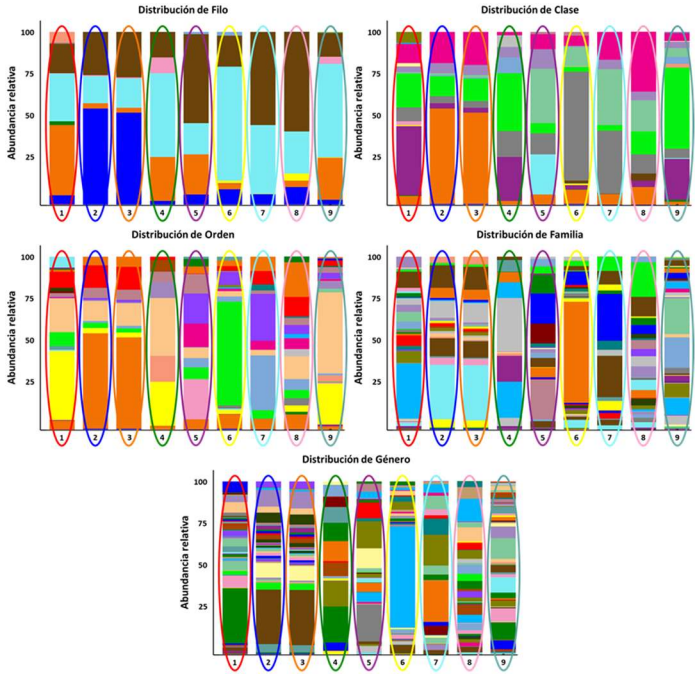
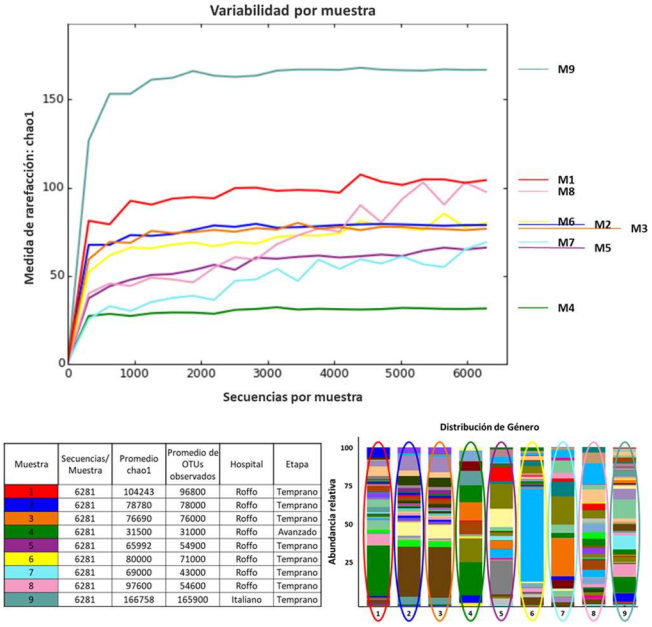


Figura 4. Abundancia relativa de los grupos taxonómicos desde el nivel Filo hasta Género, en cada una de las muestras procesadas. M1-M8: Hospital Roffo; M9: Hospital Italiano. M3: duplicado de la M2; M4: corresponde a un estadio avanzado del cáncer de mama.



Muestra	Secuencias/ Muestra	Promedio chao1	Promedio de OTUs observados	Hospital	Etapa
1	6281	104243	96800	Roffo	Temprano
2	6281	78780	78000	Roffo	Temprano
3	6281	76690	76000	Roffo	Temprano
4	6281	31500	31000	Roffo	Avanzado
5	6281	65992	54900	Roffo	Temprano
6	6281	80000	71000	Roffo	Temprano
7	6281	69000	43000	Roffo	Temprano
8	6281	97600	54600	Roffo	Temprano
9	6281	166758	165900	Italiano	Temprano

Figura 5. Índice de Diversidad Chao 1, muestra el número de OTUs bacterianas observadas en las biopsias de tejido tumoral mamario, teniendo en cuenta las muestras M3, M4 y M9.

Análisis de la diversidad alfa agrupando las muestras según los parámetros de pronóstico clásicos y otros de interés del cáncer de mama.

Para poder continuar con el análisis de los resultados, descartamos las muestras M3, M4 y M9. En la **Figura 6** se presentan los resultados obtenidos al estudiar la diversidad alfa dentro de las muestras en función de los siguientes parámetros de pronóstico clásico:

edad, tamaño tumoral, grado histológico, Ki-67, Her2/neu, RE, RP y ganglios linfáticos axilares.

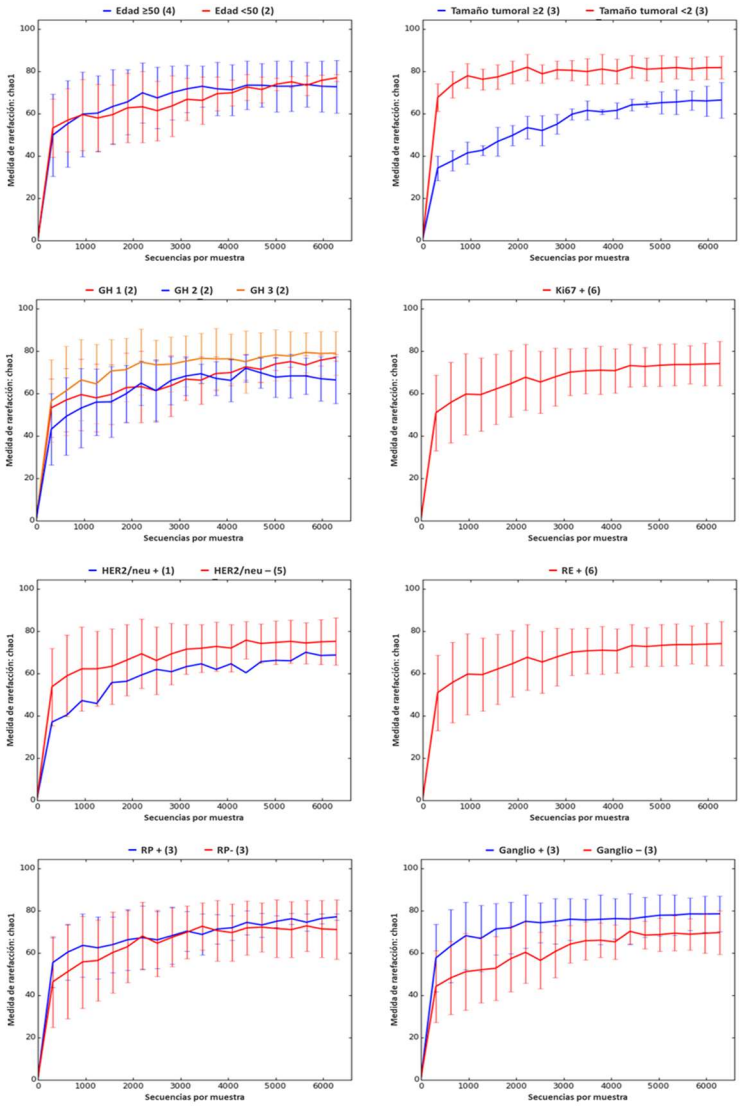


Figura 6. Las curvas de rarefacción comparan la diversidad alfa (número de OTU observado) agrupando las muestras según os distintos parámetros evaluados. Entre paréntesis se muestra el número de pacientes de cada grupo.

Solamente obtuvimos diferencia significativa en la curva de rarefaccion que tiene en cuenta el tamaño tumoral. Se ve claramente que el índice Chao 1(la diversidad taxonómica) disminuye cuando el tamaño tumoral es ≥ a 2 cm. Al aplicar el "*t-test*" de dos colas para muestras no pareadas (GraphPad Prism 8.3.1) se encontró una diferencia significativa entre el tamaño tumoral con un p-valor < 0,0001 (**Figura 7**).

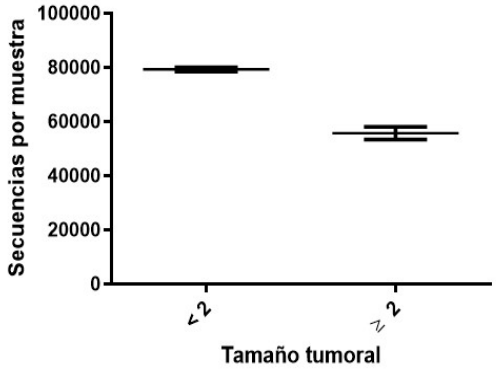


Figura 7. Gráfico que muestra la diferencia significativa entre los dos grupos de pacientes divididos por el tamaño tumoral (< 2 y ≥ 2).

En la **Figura 8** se presentan los resultados obtenidos al estudiar la diversidad taxonómica dentro de las muestras en función de algunos datos de interés como son: consumo de alcohol y tabaco, amamantamiento, menopausia, embarazo, metástasis y sobrevida.

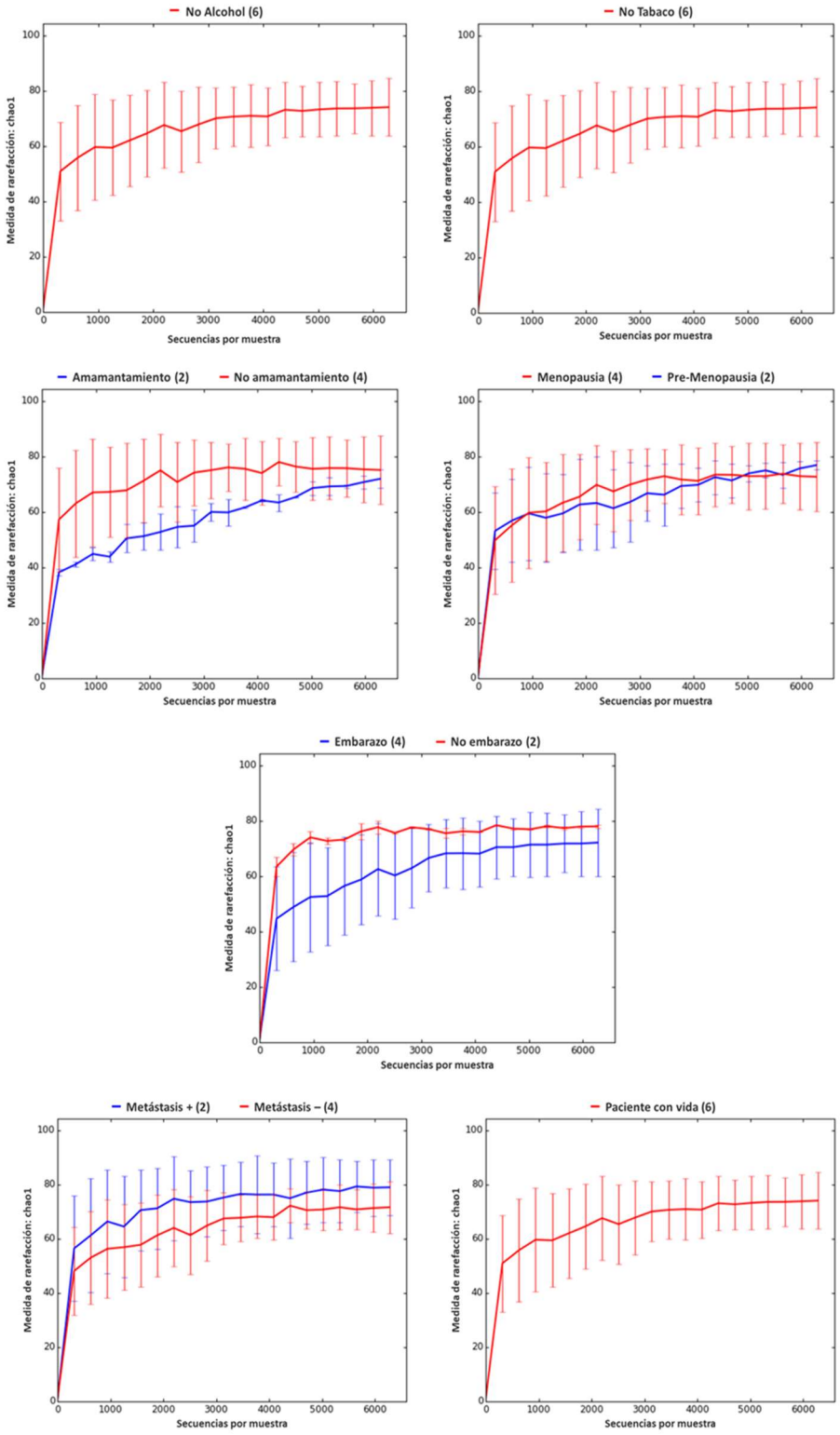


Figura 8. Las curvas de rarefacción comparan la diversidad alfa agrupando las muestras según el consumo de alcohol y tabaco, amamantamiento, menopausia, embarazo, metástasis y sobrevida. Entre paréntesis se muestra el número de pacientes que pertenecen a cada grupo.

Análisis de la composición bacteriana agrupando las muestras según los parámetros de pronóstico clásicos del cáncer de mama.

Utilizando el programa STAMP, encontramos diferencias significativas, $p < 0,05$, entre las bacterias presentes en las muestras y los parámetros evaluados (prueba t no paramétrica de White).

Al analizar las muestras según el tamaño tumoral, se identificaron 2 grupos taxonómicos a nivel de Familia (***Comamonadaceae*** y ***Sphingomonadaceae***), 2 grupos a nivel de Orden (***Actinomycetales*** y ***Bacillales***), 5 a nivel de Género (***Methylobacterium***, ***Megamonas***, ***Actinomyces***, ***Hymenobacter*** y ***Finegoldia***) y 2 a nivel de especie (***agreste*** y ***prausnitzii***) con diferencias significativas entre el tamaño tumoral (< 2 y ≥ 2) (**Figura 9**).

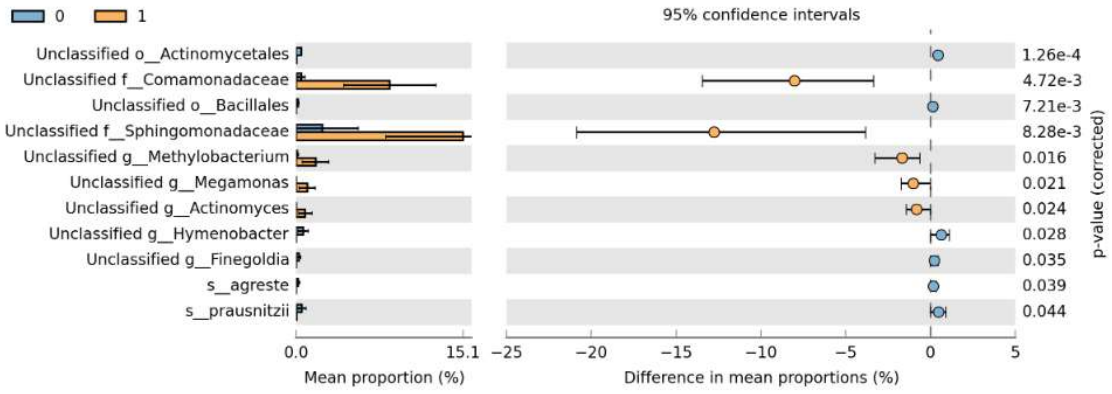


Figura 9. Diagrama de barra de error extendido que muestra la diferencia en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos que presentaron diferencias significativas al dividirla según el tamaño tumoral. (0) < 2 cm y (1) ≥ 2cm.

Se puede ver que en los tumores ≥ a 2 cm, los taxones con mayor proporción de secuencias pertenecen al nivel de Familia y fueron: ***Comamonadaceae*** y ***Sphingomonadaceae*** (**Figura 9**).

Predicción de funciones metabólicas de las comunidades microbianas presentes.

Para poder entender mejor cómo las bacterias intervienen en el desarrollo del cáncer de mama, analizamos nuestras poblaciones con el programa PICRUSt, capaz de inferir las funciones de los genes de esas bacterias. Se predijeron un total de 6.910 genes. Los genes predichos fueron categorizados según su función y nosotros utilizamos el nivel 3 de categorización de ortología KEGG. Las funciones metabólicas de las comunidades microbianas en cada uno de los parámetros estudiados fueron analizadas mediante gráficas de barras de error extendido con el software STAMP. Las funciones metabólicas graficadas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada grupo de parámetros evaluados.

Al estudiar las hipotéticas funciones metabólicas según el "Tamaño tumoral", encontramos 24 categorías funcionales significativamente diferentes entre los pacientes con Tamaño tumoral < 2 y ≥ 2 **(Figura 10)**.

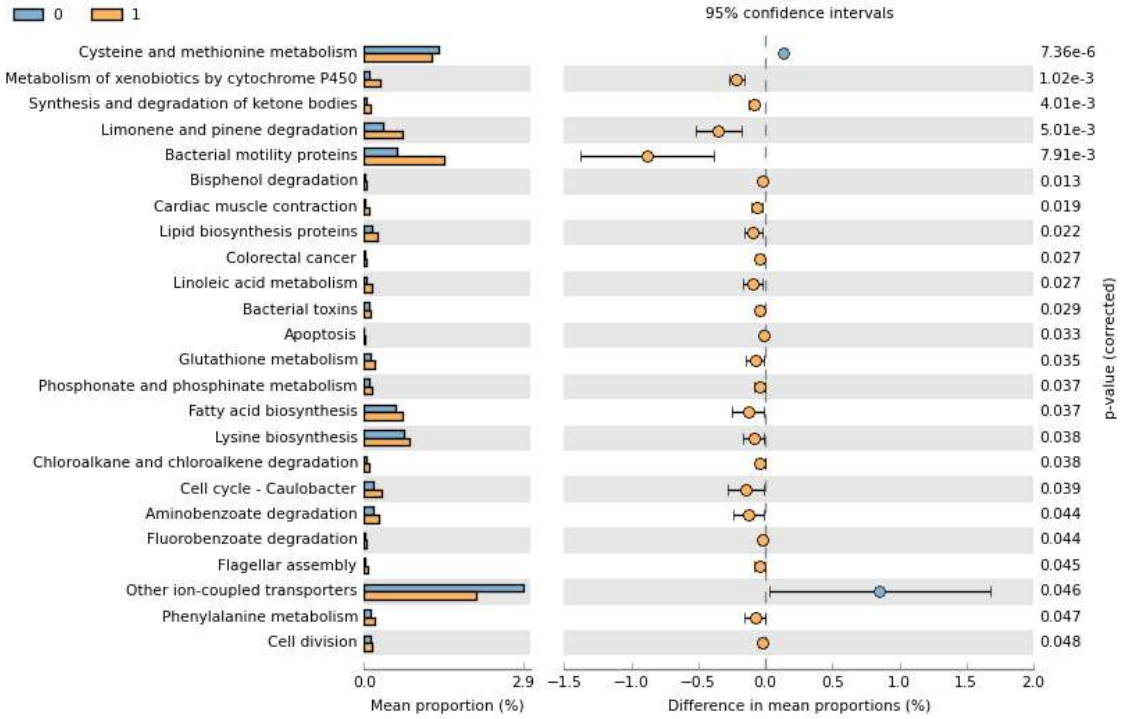


Figura 10. Diagrama de barra de error extendido que muestra las categorías funcionales significativamente diferentes encontradas en las pacientes con Tamaño tumoral < 2 (barras azules) y ≥ 2 cm (barras naranja). Prueba t de Welch's invertido de dos colas, muestran los p-valores.
0: TT < 2 (N=3), 1: TT ≥ 2 (N=3).

Las pacientes que tenían un tamaño tumoral ≥ 2 cm presentaron, en su comunidad microbiana, agentes relacionados a las siguientes funciones: Metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450, síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, degradación de limoneno y pineno, proteínas de motilidad bacteriana, degradación de bisfenol, contracción del músculo cardíaco, proteínas de biosíntesis de lípidos, cáncer colorrectal, metabolismo del ácido linoleico, toxinas bacterianas, apoptosis, metabolismo del glutatión, biosíntesis de ácidos grasos, metabolismo de fosfonato y fosfinato, degradación de cloroalcano y cloroalqueno, biosíntesis de lisina, ciclo celular, degradación de aminobenzoato, degradación de fluorobenzoato, ensamble flagelar, metabolismo de fenilalanina y división celular.

En las pacientes que tuvieron un tumor < 2 cm se encontró más abundancia en las siguientes funciones metabólicas: Metabolismo de cisteína y metionina y otros transportadores acoplados a iones. Las categorías con mayores diferencias en las medias proporcionales corresponden al metabolismo de Cisteína y metionina, metabolismo de xenobióticos por citocromo P450, síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, degradación de limoneno y pineno y a proteínas de movilidad bacteriana.

DISCUSIÓN

Grupos taxonómicos más representados en las muestras de pacientes con cáncer de mama temprano.

Al analizar la abundancia relativa de los grupos taxonómicos obtenidos en las muestras desde su clasificación en Filo hasta Género, encontramos como Filo principal los taxones ***Firmicutes*** (34,6%), ***Proteobacteria*** (30,8%), ***Actinobacteria*** (16,8%) y ***Bacteroidetes*** (14%). En concordancia con nuestros resultados, Urbaniak *et. al.* (Urbaniak *et al.* 2014; 2016), y Xuan *et. al.,* (Xuan *et al.* 2014) observaron que estos 4 grupos taxonómicos son los predominantes. Además, en el estudio de Shen Meng *et al.*, (Meng *et al.* 2018) también observaron los mismos 4 Filos que encontramos en nuestras muestras, pero con diferentes abundancias (37,6% para ***Proteobacteria***, 22,6% para ***Firmicutes***, 23,2% para ***Actinobacteria*** y 14,6% para ***Bacteroidetes***). Esto nos lleva a pensar que la predominancia a nivel Filo es compartida entre la mayoría de las mujeres con cáncer de mama porque es el escalón más alto de la división taxonómica. Las diferencias más acentuadas se encontrarán en niveles inferiores, como lo son Género y Especie.

Análisis de la Diversidad alfa.

La diferencia que hay en el microbioma de mujeres con cáncer de mama, se debe a varios factores, pero entre los más importantes, destacan algunas cuestiones como: distinto lugar de residencia (distinta cultura, factores ambientales, etc.), distinta ascendencia, y otras como, el estadio y subtipo tumoral (Urbaniak *et al.* 2014; Smith *et al.* 2019). Además, en el microbioma del intestino se vio que también existen otros factores; como la dieta, alcohol, antibióticos, estilo de vida, edad, género, presencia o no de inmunodeficiencia o hiperinmunidad (Das y Balakrish Nair 2019); que también podrían estar actuando sobre el microbioma mamario. Por lo tanto, es muy probable que las diferencias encontradas en la riqueza microbiana del tejido tumoral entre nuestras pacientes; que fue incluso, del doble en número de grupos taxonómicos; sean, al menos en parte, por estos factores.

Al obtener los resultados y observar esta diferencia entre las muestras de las pacientes, fuimos llevados a pensar en la influencia determinante que tienen los factores extrínsecos (ambiente) en el cáncer de mama.

Al analizar las curvas de diversidad alfa entre las muestras de las pacientes con los parámetros de pronóstico clásico del cáncer de mama, pudimos observar que el único resultado significativo se obtuvo al dividir las muestras en su tamaño tumoral (≥ 2 cm y < 2 cm). Observamos que las muestras de pacientes con un tamaño tumoral ≥ 2 tenían una diversidad alfa menor, es decir, que su riqueza microbiana era más escasa que en las muestras provenientes de pacientes con tamaño tumoral < 2 cm. Y esta diferencia, podría deberse a que un mayor tamaño tumoral promueva un ambiente favorable para que bacterias protumorales vean favorecido su crecimiento; no permitiendo el desarrollo de otras bacterias, entre las cuales pueden encontrarse algunas que tienen efectos antitumorales. Se sabe que un mayor tamaño tumoral conlleva una sobrevida menor en pacientes con cáncer de mama (Labovsky *et al.* 2016; Kasangian *et al.* 2017) y también en pacientes con otros tipos de cáncer (Dai et al. 2020; Sopik y Narod 2018). Además, en el trabajo de Labovsky et al., encontraron que las pacientes con un tamaño tumoral ≥ 2 cm, tenían una metástasis más temprana (Labovsky et al. 2016).

Otra explicación posible a la asociación entre mayor tamaño tumoral y menor diversidad, puede ser que la menor riqueza en el microbioma permita un ambiente favorable para que el tumor aumente de tamaño, sabiendo que el déficit microbiano permite un desequilibrio

en la microbiota, generando disbiosis, y esto promueve que algunas enfermedades se desarrollen, como, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, celiaquía, alergias, asma, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, obesidad y varios tipos de cáncer, entre otros (Carding *et al.* 2015; Kosumi *et al.* 2018).

Aun cuando la información adquirida no alcanza para saber cuál de estas dos posibilidades se está presentando (o si un conjunto de ambas), en las mujeres con cáncer de mama analizadas, nuestros resultados dejan en claro que la diversidad del microbioma y el tamaño tumoral tienen una correlación.

Posiblemente, estamos frente a un potencial tratamiento probiótico que nutra al microambiente tumoral con bacterias que promuevan un déficit en el desarrollo del tumor. Para conocer más sobre las dinámicas y relaciones entre el microbioma y el tamaño tumoral, se necesita analizar un número mayor de pacientes. Así, esos nuevos estudios podrían establecer nuevos marcadores pronóstico de la evolución tumoral en el microbioma del tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama.

Abundancia taxonómica relativa analizada según los parámetros de pronóstico clásicos y otros parámetros de interés.

Si bien la diversidad alfa nos indicó la riqueza de especies de las muestras divididas según los parámetros clásicos del cáncer de mama y otros evaluados, no nos permitió establecer si alguna de estas bacterias estaba significativamente representada en algún grupo. En este sentido, al utilizar el programa STAM pudimos encontrar las diferencias significativas en la abundancia relativa entre los diferentes niveles taxonómicos agrupando a las muestras en los distintos parámetros estudiados, pero como el único parámetro en el que se obtuvo una significativa diferencia en la diversidad alfa, fue en el tamaño tumoral, ese es el parámetro que analizaremos a continuación.

Al dividir las muestras según el tamaño tumoral, encontramos a la Familia ***Comamonadaceae*** mayormente expresado en pacientes con tumores ≥ 2 cm. Según algunos estudios (Lee et al. 2020), sus especies pueden ser utilizadas para desarrollar modelos predictivos de cáncer de vías biliares y, por lo tanto, utilizarse como biomarcador y poder diagnosticar la enfermedad de una forma más sencilla y rápida.

Además, encontramos que la especie ***F. prausnitzii*** era significativamente mayor en mujeres con tumores de tamaño < 2 cm, un hecho que se podría explicar mediante los resultados que Ji Ma y colaboradores obtuvieron en su estudio, donde encontraron que ***F. prausnitzii*** disminuye considerablemente la proliferación e invasividad tumoral, y promueve la apoptosis de células tumorales mamarias gracias a su efecto inhibitorio en la secreción de IL-6 (Ma *et al.* 2020). Esto podría explicar porque la abundancia de ***F. prausnitzii*** es menor en mujeres con tamaño tumoral ≥ 2cm donde la invasividad, proliferación e inhibición de apoptosis van en aumento para lograr una mayor expansión y supervivencia.

Predicción de las funciones metabólicas activas en los grupos taxonómicos de mujeres con cáncer de mama en estadio temprano.

En nuestro estudio pudimos encontrar algunas de las funciones metabólicas que estaban significativamente activas en los distintos parámetros estudiados. Este resultado nos permite conocer qué parámetros son acompañados de funciones metabólicas que favorecen el crecimiento tumoral.

Una función metabólica que está activa significativamente en el microbioma de mujeres con tamaño tumoral ≥ 2 es la acción de proteínas encargadas de la biosíntesis de lípidos, y según varios estudios, el metabolismo de lípidos tiene una gran incidencia en el metabolismo de las células tumorales y puede llegar a ser objetivo de nuevas estrategias terapéuticas (Blücher y Stadler 2017).

Este resultado observado en nuestro estudio podría explicarse con la necesidad energética que tiene el tumor en su desarrollo, buscando todos los medios posibles para crecer y por esto, favorece que el microbioma circundante sintetice proteínas de biosíntesis de lípidos para su crecimiento (Blücher y Stadler 2017).

Otro resultado que nos llamó la atención fue que el microbioma particular de las mujeres que amamantaron promueve la fosforilación oxidativa y, según la literatura, un incremento en esta función acompaña la metástasis (Gandhi y Das 2019) e incrementa la agresividad del tumor (Zacksenhaus *et al.* 2017). Por lo tanto, las mujeres que amamantan podrían tener una tendencia mayor a desarrollar metástasis, pero más estudios se necesitan para entender cuáles son las causas de que la fosforilación oxidativa esté más activa en mujeres que amamantaron.

CONCLUSIÓN

Concretamente en este estudio, pudimos apreciar como distintas situaciones específicas pueden modelar el microbioma circundante mamario con el fin de ayudar o combatir el crecimiento de las células cancerígenas. También observamos que el cambio en el tamaño tumoral tiene consecuencias sobre la diversidad del microbioma mamario y en como modulan el crecimiento de las células tumorales mediante distintas vías metabólicas.

Aun así, estas investigaciones se encuentran en sus inicios, y la evidencia también sigue siendo poco clara en cuanto al rol de determinados grupos taxonómicos. Se necesitan estudios adicionales para entender qué grupos taxonómicos son lo suficientemente significativos como para tener una gran influencia sobre las células tumorales con el fin de contrarrestar su crecimiento y promover la sobrevida del paciente, además de ser utilizados como biomarcadores predictivos para los distintos estadios tumorales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLÜCHER, C. y STADLER, S.C., 2017. /pmc/articles/PMC5670108/.
- BURNS, M.B., LYNCH, J., STARR, T.K., et al. 2015. DOI:10.1186/s13073-015-0177-8.
- CARDING, S., VERBEKE, K., VIPOND, D.T., et al. 2015. /pmc/articles/PMC4315779/.
- CHAN, A.A., BASHIR, M., RIVAS, M.N., et al. 2016. DOI:10.1038/srep28061.
- DAI, W., MO, S., XIANG, W., et al. 2020. /pmc/articles/PMC7066694/.
- DAS, B. y BALAKRISH NAIR, G., 2019. DOI:10.1007/s12038-019-9926-y.
- FRANK, D.N., ST. AMAND, A.L., FELDMAN, R.A., et al. 2007. DOI:10.1073/pnas.0706625104.

- GANDHI, N. y DAS, G., 2019. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30691108/.
- GAO, Z., TSENG, C.H., STROBER, B.E., et al. 2008. DOI:10.1371/journal.pone.0002719.
- HILTY, M., BURKE, C., PEDRO, H., et al. 2010. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20052417/.
- KASANGIAN, A.A., GHERARDI, G., BIAGIOLI, E., et al. 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0189127. Disponible en: /pmc/articles/PMC5718505/.
- KOSUMI, K., MIMA, K., BABA, H. y OGINO, S., 2018. https://jlpm.amegroups.com/article/view/4514/5534.
- LABOVSKY, V., MARTINEZ, L.M., CALCAGNO, M.deL., et al. 2016. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/62556.
- LARSEN, N., VOGENSEN, F.K., VAN DEN BERG, F.W.J., et al. 2010. DOI:10.1371/journal.pone.0009085.
- LEE, H., LEE, H.K., MIN, S.K. y LEE, W.H., 2020. https://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12957-020-1793-3
- LEHOURITIS, P., CUMMINS, J., STANTON, M., et al. 2015. DOI:10.1038/srep14554.
- MA, J., SUN, L., LIU, Y., et al. 2020. https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-01739-1.MENG, S., CHEN, B., YANG, J., et al. 2018. DOI:10.3389/fonc.2018.00318.
- MIRA-PASCUAL, L., CABRERA-RUBIO, R., OCON, S., et al. 2014. DOI:10.1007/s00535-014-0963-x.
- MUELLER, S., SAUNIER, K., HANISCH, C., et al. 2006. DOI:10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006.
- SMITH, A., PIERRE, J.F., MAKOWSKI, L., et al. 2019. DOI:10.1038/s41598-019-48348-1.
- SOPIK, V. y NAROD, S.A., 2018. DOI:10.1007/s10549-018-4796-9.
- URBANIAK, C., CUMMINS, J., BRACKSTONE, M., et al. 2014. DOI:10.1128/AEM.00242-14.
- URBANIAK, C., GLOOR, G.B., BRACKSTONE, M., et al. 2016. DOI:10.1128/AEM.01235-16.
- XUAN, C., SHAMONKI, J.M., CHUNG, A., et al. 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0083744.
- ZACKSENHAUS, E., SHRESTHA, M., LIU, J.C., et al. 2017. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29120753/.

ABSTRACT

Microbiome composition reflects the host's genetic and lifestyle variables, contributing it's dysbiosis to the risk of developing breast cancer. Patients from diverse countries show different microbial profiles, thus led us to analyze the microbiota in breast cancer patients in Argentina.

In order to study the prognostic relevance of the microbiota in the evolution of early breast cancer, a study was carried out including biopsies of frozen/fresh breast tumor tissues (Hospital Roffo, n=7 and Hospital Italiano, n=1, respectively). Inclusion criteria: women with invasive ductal breast carcinoma, clinicopathological stage I/II with a 5-year follow-up minimum. Exclusion criteria: patients with prior treatment, underlying immune disease or another prior tumor. Samples were processed and DNA was extracted using the QIAamp-DNA-Mini- Kit. The bacterial profile was identified studying V4-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. OTUs classification and Alpha and Beta diversity analysis were performed, in order to study possible associations with parameters such as age, tumor size, histological grade, Ki-67, Her2/neu, ER, PR, axillary lymph nodes and tumor evolution.

Taxonomic analysis of these samples indicated that Firmicutes (34.6%) and Proteobacteria (30.8%) are the most representative phyla. We observed that the sample from the H. Italiano presented greater diversity (165k) than the ones from the H. Roffo (43k-96k), therefore the first was not taken into account for the analysis. Alpha diversity analysis showed a significant difference between tumor dimensions, showing a decrease in diversity with the tumor size increase (p-value<0.0001, "t-test"two-tailed). To conclude, H. Italiano's sample presents a higher OTUs diversity in comparison with H. Roffo samples. In addition, the analysis of different bacterial populations among patients with different tumor sizes opens up new paths on the development of alternative therapies to improve the patient's life-quality.

EVALUACIÓN DEL APORTE DEL AGUA DE BEBIDA A LA INGESTA DIARIA DE CALCIO EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

Mercedes Lombarte, Maria Eugenia Chulibert, Maela Lupo, Alfredo Rigalli

Laboratorio de Biología Ósea, Catedra de Química Biológica,
Facultad de Cs. Médicas. Universidad Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es el principal factor de riesgo, tanto en Argentina como a nivel global, de años perdidos por incapacidad y muerte que además conlleva a enormes gastos en cuidados médicos. La prevención de la hipertensión arterial es una de las estrategias más importante para reducir la incidencia y la carga de enfermedad de las enfermedades isquémicas, la principal causa de muerte a nivel global (1). Numerosos estudios hallaron una asociación inversa (2) entre la ingesta de calcio (Ca) en la dieta y la presión arterial (PA) en ratas (3), individuos jóvenes (4) y mujeres embarazadas (5). Además, se ha observado que la incidencia de preeclampsia puede reducirse en poblaciones de baja ingesta de Ca mediante la administración de suplementos de Ca, (6, 7, 8) y que la descendencia de madres suplementadas con Ca tuvo una menor incidencia de PA alta que la descendencia de las madres que recibieron placebo; lo que sugiere que la restricción del Ca fetal influye en la génesis de la hipertensión en etapas posteriores de la vida (9). Este mismo efecto fue observado en experimentos realizados en ratas (10).

En Argentina la ingesta de Ca está por debajo de las recomendaciones que son de 1000 mg/día para adultos y 1200 mg/día durante el embarazo. La Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS), evidenció una mediana de ingesta de 446 mg/día para las mujeres embarazadas y 367 mg/día para las mujeres de edades comprendidas entre 19 y 49 años y de 700 mg/día en menores de 5 años. Según los datos publicados más del 94% de las mujeres y cerca de la mitad de los niños/as entre 2 y 5 años no alcanzan los valores de ingesta adecuada (11). Sin embargo, el consumo de agua no fue evaluado en esta oportunidad. Dependiendo de la cantidad de calcio que contenga el agua que consume esta población la ingesta de calcio podría ser más elevada.

La cantidad de minerales que contiene el agua de consumo humano es muy variable (12). Las variaciones dependen de la procedencia, el tratamiento que recibe el agua antes de su consumo y a la forma de distribución (13). Datos de Canadá y US muestran que el contenido de calcio en el agua de red varía entre 8.3 a 135 mg/l (14), en España entre 0.5 a 332 mg/l (15) y entre 64 a 523 mg/l Argelia (16). En Argentina no existen datos publicados del contenido de minerales en el agua de consumo público, agua de red o agua de pozo. Los controles de calidad que se realizan en las plantas de potabilización de agua no incluyen el análisis del contenido de calcio (17) y las tablas de composición química de alimentos nacionales tampoco cuentan con estos datos (18). La biodisponibilidad de calcio del agua de consumo es alta y, al igual que el calcio que proviene de otros alimentos, está influenciada por la ingesta simultánea de otros alimentos y nutrientes (19, 11). Teniendo en cuenta esta información, el agua puede representar una fuente

importante de calcio y contribuir a cubrir los requerimientos diarios mínimos. Conocer el contenido de calcio del agua que consumen la población permitirá estimar la ingesta de este mineral de manera más completa y evaluar su contribución a las recomendaciones nutricionales de ingesta de calcio. Por lo tanto, el objetivo general de este proyecto fue determinar el aporte del agua de bebida a la ingesta diaria de calcio en la República Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras.

Durante el primer trimestre del proyecto se desarrollaron estrategias de difusión entre los alumnos de la Facultad de Cs Médicas de la Universidad Nacional de Rosario para la recolección de muestras procedentes de diferentes partes del país. Para la difusión se emplearon las diferentes redes sociales que posee el Laboratorio de Biología Ósea y se organizaron reuniones informativas.

Se adquirió el material necesario para la realización de la recolección de las muestras de agua de diferentes localidades del país.

Las mediciones de calcio se hicieron en aguas de consumo individual y no por población ya que el consumo de agua se ve influenciado por diversos factores sociales determinando que el consumo pueda ser de pozo, red, ósmosis inversa o embotellada, aun cuando existe una red de distribución. El conocimiento del contenido de calcio a redes de distribución a nivel de localidades sería inadecuado para poder establecer un porcentaje de consumo.

Gestión de muestras.

Se diseñó un software para la administración, gestión y control de las muestras de agua y las determinaciones a realizarse. El software funciona en el entorno de R y permite la carga de los datos identificatorios de cada muestra. El software asigna un código alfanumérico que determina de allí en adelante un trabajo sin conocer origen de la muestra. Éste, además, permite la carga de las variables medidas en cada instrumento, de manera autónoma realiza los cálculos de concentración y los controles de calidad. También permite el análisis estadístico de las variables y un seguimiento del control de calidad de las determinaciones. Al software se ingresa con una clave personal que permite el registro de usuarios facilitando la detección y control de errores durante la carga y análisis de datos. La Figura 1 representa un diagrama de flujo del software mencionado, en archivos adjunto se anexa el script de funcionamiento de dicho software.

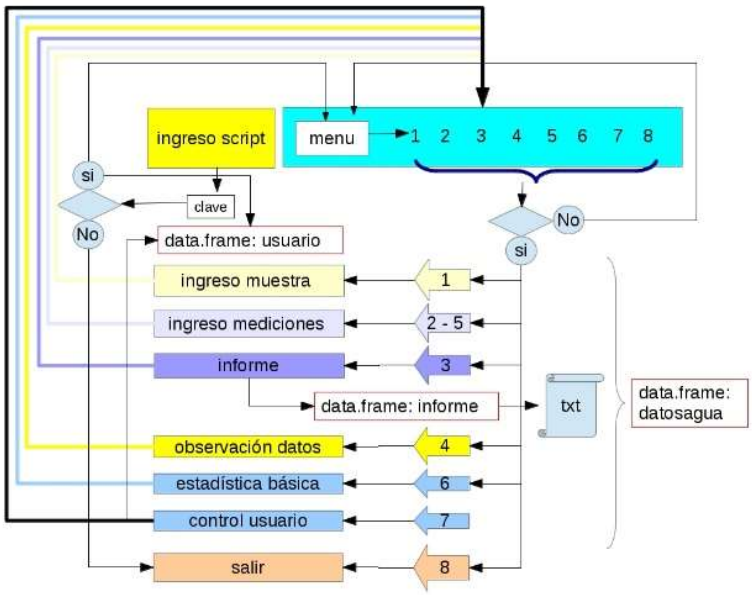


Figura 1. Diagrama de flujo del software desarrollado para la carga, procesamiento y análisis de datos.

Medición de calcio en agua.

Para la medición de calcio se utiliza un espectrofotómetro de absorción atómica Arolab MK II. Las muestras se diluyen con agua destilada fijando la concentración de $SrCl_2$ en 2% para eliminar sustancias interferentes. Se utiliza una curva de calibración con concentraciones de calcio 0-100 ug/ml. Las muestras se volatilizan en una la llama que se obtiene por mezcla de acetileno:aire en proporción 1.5:1. La técnica permite detectar valores de 10-100 ug Ca/ml en la mezcla final que es aspirada para medición. Dado que la misma debe recibir un agregado de $SrCl_2$ 20% de manera de hacer la mezcla un 2% $SrCl_2$, la mezcla puede ser diluida entre 2 y 10 veces. Además, el volumen de mezcla mínimo necesario para la determinación es de 2 ml (aproximadamente). Por lo tanto, la sensibilidad puede variar entre 20-200 ug/ml si se hace dilución al ½ y el volumen requerido de muestra es aproximadamente 1 ml. Si se diluye 10 veces la sensibilidad esta entre 100-1000 ug/ml y el volumen requerido es de 0.2 ml. Todas las muestras se procesan por duplicado aceptando un coeficiente de variación menor al 10%. Además, se procesa una solución control de calidad de la que se conoce la media de su concentración medida en múltiples oportunidades, así como el desvío estándar de estas mediciones. Con la media, el desvío estándar del control de calidad y la medición que se realiza con cada lote de mediciones se calculan las unidades de desvío estándar (UDS), valor que debe caer dentro del rango [-2,2] para que el lote de determinaciones se considere adecuado.

Para la puesta a punto de la técnica se determinó el contenido de calcio del agua de red de la ciudad de Rosario (n=30) hallando una concentración de calcio de:15.36±5.25mgCa/l. La medición presentó un CV%: 1.98±1.13. La Figura 2 muestra la gráfica de UDS de todos los lotes de determinaciones.

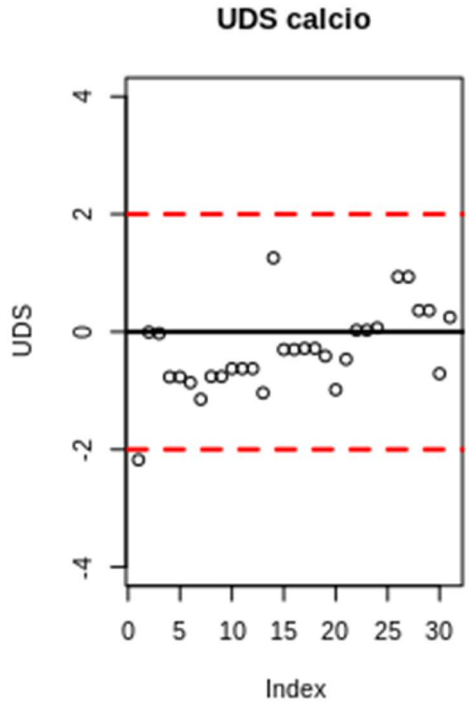


Figura 2. Unidades de desvío estándar (UDS) de la determinación de Ca.

Medición de dureza del agua.

La determinación de dureza se basa en la titulación con el ácido etilendiaminotetraacético y sus sales de sodio (EDTA) que forman un complejo de quelato soluble al añadirlo a las soluciones de algunos cationes metálicos usando negro de eriocromo T como indicador de punto final. Este método es aplicable a aguas potables, superficiales, contaminadas y aguas residuales.

Para la puesta a punto de la técnica se determinó el contenido de calcio del agua de red de la ciudad de Rosario (n=30) hallando una dureza total de: 94.9±3.3mg$CaCO_3$/l. La medición presentó un CV%: 12.7±7.3. La Figura 3 muestra la gráfica de UDS de los lotes de determinaciones.

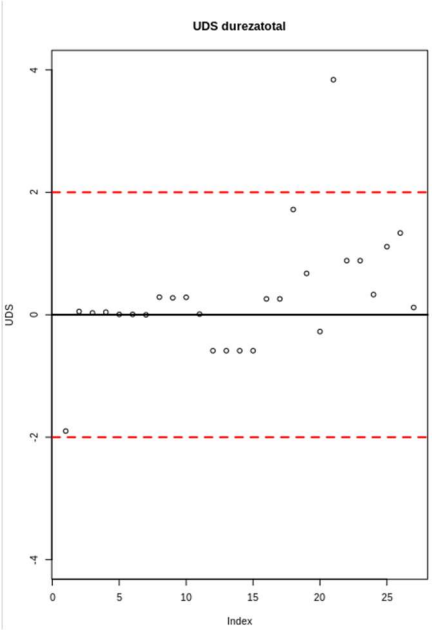


Figura 3 Unidades de desvío estándar (UDS) de la determinación de dureza total.

RESULTADOS

Durante la realización del proyecto se recolectaron y midieron 399 muestras. Las mismas fueron obtenidas a través de alumnos de la Facultad de Cs Médicas de la UNR que fueron contactados a través de las diferentes redes sociales que posee el Laboratorio de Biología Ósea. Además, se organizaron reuniones informativas donde se les instruyó a cerca de la metodología de obtención y conservación de la muestra.

Las muestras obtenidas provienen de diferentes localidades del país y de diferentes fuentes. De las 399 muestras remitidas al Laboratorio de Biología Ósea, 206 provienen de sistemas de suministro de agua (agua de red), 147 muestras de pozos privados, 13 se reportaron como provenientes de plantas de ósmosis inversa, 13 se informa fueron sometidas al proceso de filtrado empleando filtros domésticos y 20 corresponden a aguas envasadas. En el muestreo se encuentran representados 127 municipios de 23 provincias argentinas.

Se midió la concentración de calcio y la dureza total de las muestras remitidas al laboratorio.

En conjunto las muestras presentan una mediana de la concentración de calcio de 12.78 mgCa/l y un rango de 0 a 317.58 mgCa/l y una mediana de la dureza total de 130.67 mg$CaC0_3$/l y un rango de 0 a 1711.08 mg $CaC0_3$/l.

La Figura 4 muestra la mediana y rango para la concentración de calcio medida en las muestras de agua remitidas al Laboratorio de Biología Ósea cuando se realiza la evaluación por tipo de fuente de suministro de agua. Los valores de calcio de aguas de diferentes fuentes de suministro se compararon por medio de un ANOVA a un criterio empleando post test LSD. Se halló que la fuente de suministro de agua afecta el contenido de Ca de esta, siendo mayor el contenido en las aguas de pozo que en las aguas envasadas, de osmosis inversa o de red.

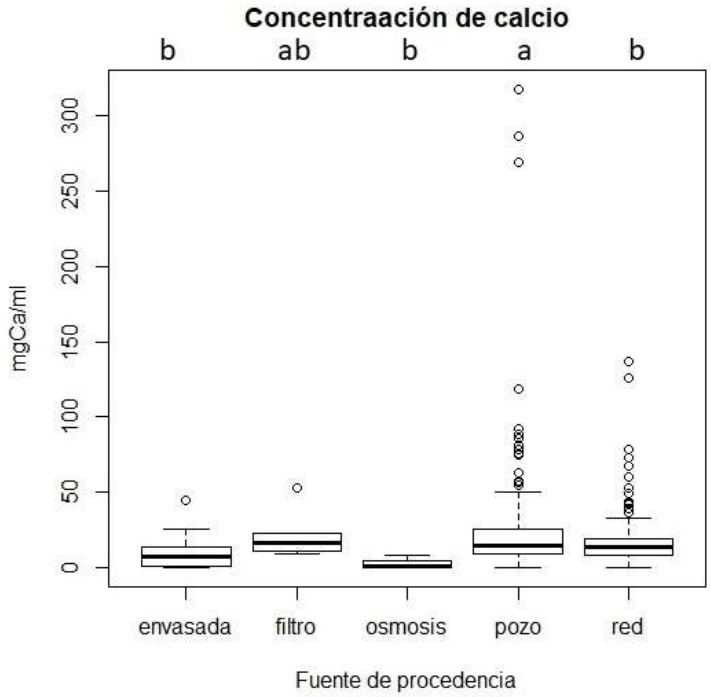


Figura 4. Mediana y rango para la concentración de Ca agrupadas por tipo de fuente de suministro. En el borde superior del gráfico se indican con letras las diferencias entre las fuentes de procedencia. Todas las letras diferentes entre dos fuentes de procedencia indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA a un criterio post test LSD $p<0.01$.

La Figura 5 muestra la mediana y rango para la dureza medida en las muestras de agua remitidas al Laboratorio de Biología Ósea cuando se realiza la evaluación por tipo de fuente de suministro de agua. Los valores de dureza total del agua proveniente de diferentes fuentes de suministro se compararon por medio de un ANOVA a un criterio empleando post test LSD. Se halló que la fuente de suministro de agua afecta la dureza de esta, siendo mayor el contenido en las aguas de pozo que en las aguas envasadas, de osmosis inversa, tratadas con filtros domésticos o de red.

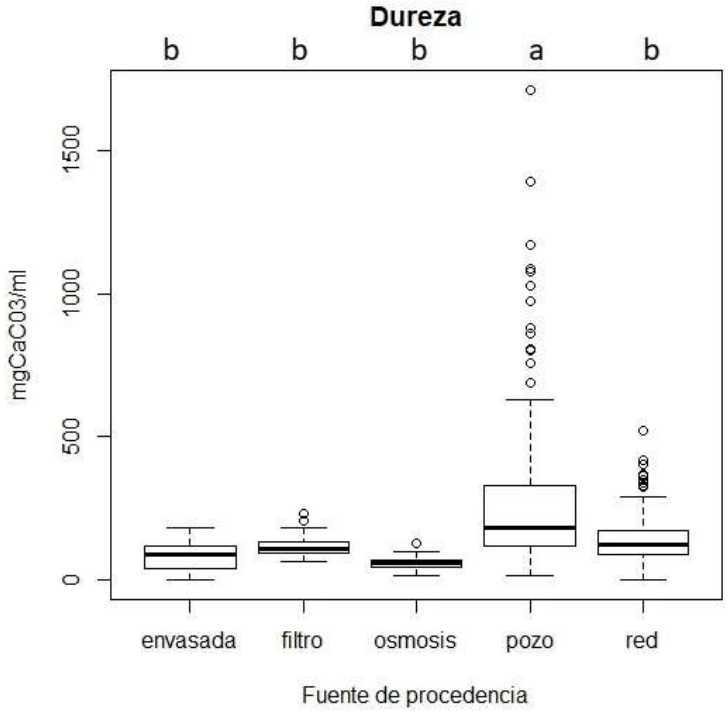


Figura 5. Mediana y rango para la concentración dureza total del agua por tipo de fuente de suministro. En el borde superior del gráfico se indican con letras las diferencias entre las fuentes de procedencia. Todas las letras diferentes entre dos fuentes de procedencia indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA a un criterio post test LSD $p<0.01$.

DISCUSIÓN

En la práctica se considera que la dureza es causada por iones metálicos divalentes, capaces de reaccionar con el jabón para formar precipitados y con ciertos aniones presentes en el agua para formar incrustaciones. Los principales iones que causan dureza en el agua son: Ca^{2+}, Mg^{2+}. En general, la dureza es igual a la concentración de cationes polivalentes del agua. La dureza total se define como la suma de las concentraciones de calcio y magnesio, ambos expresados como carbonato de calcio, en miligramos por litro. Los datos nos muestran que, aunque algunas localidades poseen agua con alta dureza esta no es debida a altas concentraciones de calcio. Además, se observa (como era de esperar) que las aguas de pozo son las que poseen mayor contenido mineral.

El calcio es un mineral esencial para mantener la salud integral de los individuos. Su concentración en el agua potable no presenta límites ni inferiores ni superiores en la actualidad. La cantidad de calcio en el agua potable es variable, esta variabilidad depende del origen, el tratamiento recibido y el sistema de distribución. Los datos publicados sobre el contenido mineral del agua en Argentina son escasos, el control de calidad no requiere un análisis de calcio y, por lo tanto, esta información no siempre está disponible.

La mayoría de las muestras de agua presentaron niveles de calcio muy por debajo de 50 mgCa/l, con un nivel de calcio promedio de 13.1±10.0 mgCa/l con valores similares entre los distintos sistemas de suministro, las aguas provenientes de pozos privados son las que presentaron mayor contenido de calcio. Las aguas obtenidas por el proceso de ósmosis inversa presentaron un menor contenido de calcio acorde al tratamiento recibido. Es

importante destacar que el agua de red que distribuye una planta potabilizadora puede provenir de diferentes fuentes naturales de agua; siendo los más habituales cursos de agua superficiales como ríos o arroyos, o perforaciones que permiten obtener agua subterránea. La cantidad de calcio presente en el agua de consumo si consideramos una ingesta diaria promedio de 2l de agua por día por persona aporta en el mejor de los casos (agua con 50mgCa/l) solo un 10% del calcio diario requerido (1000mgCa/día/persona). Por lo tanto, el agua de consumo no realiza un aporte biológicamente importante a la ingesta de calcio diaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lancet 2017; 390(10100):1211-59.
2. Am J Clin Nutr 1983; 38: 457-61.
3. Am J Obstet Gynecol 1981; 141(2):163-69.
4. JAMA 1983; 249(9):1161-65.
5. Am J Obstet Gynecol 1983; 146(2):175-180.
6. Am J Obstet Gynecol 1988; 158(4):898-902.
7. Cochrane Database Syst Rev 2002;(1):CD001059.
8. New Eng J Med 1991; 325: 1399-405.
9. BMJ 1997; 315(7103):281-85.
10. Br J Obstet Gynaecol 2002;109(5):540-45.
11. Encuesta ENNyS. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. Documento de resultados. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2007.
12. WHO. Calcium and Magnesium in Drinking Water. Public Health Significance. 2009.
13. Atlas Ambiental de Buenos Aires, Agencia de Protección Ambiental.
14. HSS J, 2006: 130-5.
15. Medicina clinica 131, no. 17 (2008): 641-646.
16. Sante, 2005: 109-12.
17. Argentina. Ley 26221, febrero 28 de 2007.
18. Programa informático para Análisis de Encuestas Alimentarias – SARA - Ministerio de Salud de la Nación, República Argentina. http://www.msal.gov.ar/htm/Site/ennys/site/sara.asp, (accessed July 2009).
19. Osteoporos Int, 2000: 938-943.

ABSTRACT

Calcium is an essential nutrient, its deficit in intake is associated with different pathologies. In Argentina, the intake of Ca is below the daily recommendations. However, water consumption was not considered. The amount of minerals contained in water for human consumption is highly variable and there are no published data on the content of minerals in public drinking water. Therefore, the objective of this project was to determine the contribution of drinking water to daily calcium intake in the Argentine. Dissemination strategies were developed among the students of the FCM-UNR to collect samples. A software was developed for the administration, management and control of the water samples and the measures. 399 samples were collected and measured, they come from different locations (127 municipalities from 23 Argentine provinces) and from different sources (206 come from water supply systems, 147 from private wells, 13 from reverse osmosis plants, 13 from household filtering process, and 20 from bottled water). Calcium concentration (Arolab MK II atomic absorption spectrophotometer) and total hardness (by titration with EDTA) of the samples were measured. Overall, the samples have a median (range) of calcium concentration: 12.78 (0 to 317.58) mgCa/l and total hardness: 130.67 (0 to 1711.08) mg CaC03/l. It was found that the source of the water supply affects both the Ca content and its hardness, being higher the content in the well water (One-way ANOVA and LSD post-test, $p<0.01$). Most of the samples had calcium levels below 50 mgCa/l, with an average calcium level of 13.1±10.0 mgCa/l. If we consider an average daily intake of 2l of water/day/person, this amount of calcium present in drinking water contributes in the best of cases (water with 50mgCa/l) only 10% of the daily calcium required (1000mgCa/day/person).

EFECTOS GENÓMICOS Y NO-GENÓMICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: INTERACCIÓN CON HORMONAS SEXUALES ESTEROIDEAS

Constanza M. López Fontana

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU),
CCT Mendoza, CONICET

ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Objetivo Específico 1. Determinar si los estados de hipo e hipertiroidismo se asocian con el riesgo de cáncer de próstata (CaP) y establecer su dependencia del balance hormonal esteroideo.

Para ello, reclutamos 143 voluntarios. Se determinaron los niveles plasmáticos de triiodotironina (T3) y tiroxina (T4), hormona estimulante de la tiroides (TSH), estrógeno, testosterona y antígeno prostático específico (PSA). Todos los voluntarios firmaron un consentimiento escrito al protocolo aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo (Ref. EXP-CUY: 1267/2017).

Sin embargo, debido a las dificultades para reclutar voluntarios con hipo- o hipertiroidismo que no se encuentren con el tratamiento tiroideo correspondiente al ingresar al estudio dificultando su asociación con el riesgo de CaP, decimos desarrollar un modelo de adenocarcinoma de próstata en animales. A tal efecto, realizamos una capacitación en técnicas de inducción y manejo de tumores en modelos murinos en el Departamento de Bioterio y Cáncer Experimental, Área de investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Buenos Aires. Luego, pusimos a punto el modelo de cáncer de próstata mediante la inoculación de células TRAMP-C a nivel subcutáneo en ratones C57B con hipo e hipertiroidismo experimental a fin de determinar si los desórdenes tiroideos afectan la latencia y progresión de los tumores prostáticos. Para ello, 5×10^6 células TRAMP c1 /200ul fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco izquierdo de ratones machos C57BL/6 de 8 semanas. Luego, los ratones fueron aleatoriamente asignados en uno de los siguientes grupos: ratones hipotiroideos (HypoT, por la administración crónica de 0.01% de propiltiouracilo –PTU-, Sigma P3755, en el agua de bebida; n=10), ratones hipertiroideos (Hyper, por la inyección s.c de 20 ug/ratón/día de T4, Sigma T2376; n=10) y ratones eutiroideos como controles (EUT, n=10). Todos los animales fueron observados diariamente hasta la aparición de tumores palpables. La latencia de aparición de tumores fue evaluada a partir del tiempo transcurrido desde la inoculación de las células tumorales hasta la aparición del primer tumor mamario palpable. La progresión de cada tumor fue estudiada midiendo el aumento de su diámetro mayor (DM) y menor (dm) cada 72 h mediante un calibre, y calculando su volumen tumoral (VT=dm2xDM/2) y la velocidad de crecimiento (Vel=VT/[día de sacrificio-día de detección]). Finalmente, se realizaron curvas de supervivencia de los tumores para los tres grupos de ratones.

Objetivo Específico 2. Analizar los cambios genómicos y no genómicos producidos por las HT en explantos de tumores de próstata humanos y determinar su interacción con esteroides sexuales en estos efectos.

El presente objetivo no pudo llevarse a cabo debido a la situación sanitaria "Pandemia COVID 2019" ya que se restringieron al máximo las consultas y las prácticas médicas (biopsias), y se negó el acceso de personal no esencial a las instituciones de salud. Recién durante el segundo semestre del año 2021, hemos recolectando 10 muestras de biopsias prostáticas ecodirigidas de CaP. Dentro de la primera hora posterior a la biopsia, las muestras se lavaron y fraccionaron en partes iguales. Posteriormente, se les adicionó, por separado o en forma combinada, una concentración final de 10^{-10} M de T4 libre; 10^{-9}M de 17β estradiol y/o 10^{-8}M de dihidrotestosterona (DHT) preparadas en DMEM/F12 sin rojo fenol con 1% de Suero fetal bovino charcolizado (SFBc). Se incubaron durante 24h y se procesaron para estudiar la expresión de caspasa 3 y PCNA por de inmunohistoquímica.

Objetivo Específico 3. Estudiar los efectos genómicos y no genómicos directos de las HT sobre la proliferación, adhesión y migración de células epiteliales tumorales prostáticas e indirectos alterando aquellos propios de los esteroides sexuales.

Durante el periodo a informar, hemos estudiado el efecto del tratamiento con T4, sola o combinado con DHT y E2, sobre la proliferación, viabilidad, adhesión y migración de líneas celulares tumorales prostáticas humanas: LNCaP (AR+, REβ+, TRβ1+); PC3 (REα+, REβ+, TRβ1+; y AR-) y DU145 (REβ+, TRβ1+; AR-). Estas células se cultivaron en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB) en estufa a 37ºC con 5% de tensión de CO2. Al alcanzar el 80% de confluencia, las células fueron deprivadas de factores de crecimiento reemplazando el medio por DMEM/F12 sin rojo fenol libre de SFB. Posteriormente, se adicionó, por separado o en forma combinada, una concentración final de 10^{-10} M de T4 libre, 10^{-8} M de DHT y/o 10^{-9} M de E2 preparadas en DMEM/F12 sin rojo fenol con 1% de SFB charcolizado. Se realizaron los siguientes ensayos biológicos:

- Proliferación celular: se utilizó el ensayo de proliferación MTT para células vivientes (Cell titer 96, Promega, USA) a las 24h y 6 días.
- Viabilidad celular: fue evaluada con el colorante Azul Tripán a las 24h.
- Ensayo de adhesión: las células prostáticas fueron incubadas por 2 hs con los diferentes tratamientos hormonales. Se tripsinizaron y sembraron $2x10^4$ células/pocillo en medio libre de suero (en placas de 96 pocillos) para permitir adherirse por 1 hora a 37 ºC. Luego de este tiempo, las células no adheridas se aspiraron y se realizó un ensayo de MTT.
- Cierre de la herida. Los cultivos fueron observados y fotografiados inmediatamente después del corte y a las 6h; y se utilizó el programa Image J (NIH) para cuantificar el área de la herida.

El Análisis estadístico se realizó mediante ANOVA I o Kruskal Wallis según la normalidad de la muestra y Bonferroni como post test. Las variables cualitativas serán analizadas por Chi-cuadrado. La significancia estadística se establecerá con un $p<0.05$.

RESULTADOS FINALES OBTENIDOS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Objetivo Específico 1. Determinar si los estados de hipo e hipertiroidismo se asocian con el riesgo de cáncer de próstata (CaP) y establecer su dependencia del balance hormonal esteroideo. (Estado de avance estimado: 100%).

Para ello, 143 hombres, entre 45 y 75 años, fueron elegidos al azar de una consulta urológica voluntaria. Se excluyeron todos aquellos voluntarios con trastornos hemorrágicos por biopsias, con sonda vesical a permanencia, medicados con inhibidores de la 5-α-reductasa, con CaP antiguo u otro tumor urológico asociado, con enfermedades crónicas como insuficiencia renal, hepática o respiratoria. Luego, la población fue subdividida en: controles (libres de enfermedad; n=46); Alto riesgo (pacientes con PSA entre 4 y 10 ng/ml con biopsias prostáticas reiteradas negativas, con antecedente familiares de CaP, con PIN de alto grado o ASAP; n=43); y con CaP (n=54) (Figura 1). La Tabla 1 muestra las características urológicas y hormonales de la población estudiada. Pudimos observar que los voluntarios con CaP presentaron niveles séricos de T4 ($p<0.01$), testosterona ($p<0.004$) y estrógenos ($p<0.009$) más elevados que los controles.

Figura 1. Población estudiada.

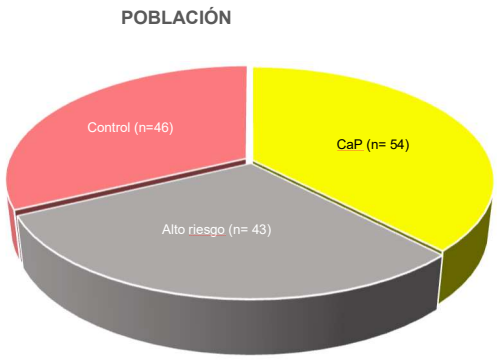


Tabla 1. Características urológicas y hormonales de la población estudiada.

	CaP	***Alto riesgo***	***Control***	***P***
Volumen prostático (cc)	***47 ± 16.69***	***46.3 16.34***	***36.6 ± 13.9***	*0.11*
PSA (ng/ml)	***11.3 ± 20.0***	***4.91 ± 0.45***	***1.3 ± 0.9***	*0.007***
T4 (ng%)	***6.21 ± 0.35***	***7.87 ± 0.48***	***4.32 ± 1.34***	*0.01***
T3 (ng/100ml)	***101.7 ± 22.5***	***107.6 ± 11.8***	***84.47 ± 9.3***	*0.32*
TSH (uU/ml)	***1.61 ± 0.08***	***1.74 ± 0.31***	***3.30 ± 0.84***	*0.07*
Estrógeno (pg/ml)	***38.29 ± 1.16***	***36,34 ± 1.61***	***29.96 ± 2.25***	*0.009***
Testosterona (ug/l)	***5.15 ± 0.42***	***4.39 ± 0.21***	***3.74 ± 0.22***	*0.004***

Con respecto a los resultados obtenidos mediante el modelo murino de CaP (Figura 2), detectamos una mayor latencia de aparición de los tumores en HypoT (56.64 $\pm$ 6.25 días) con respecto a Hyper (39.33 $\pm$ 2.09 días) y a EUT (37,71 $\pm$ 5.6 días). La incidencia fue menor en los ratones HypoT (75%) que en los EUT e Hyper (100%), y la sobrevida fue significativamente mayor en los HypoT ($p \leq 0.05$).

Por su parte, el volumen tumoral y la velocidad de crecimiento tumoral fue mayor en los tumores de Hyper ($p<0.05$, Figura 2 C y D). En concordancia, la inmunotinción de PCNA fue mayor y la caspasa 3 fue menor en los tumores Hyper que en los EUT ($p<0,05$, Figura 3). Además, la relación mitosis/apoptosis de los tumores Hyper fue mayor que la de los tumores EUT ($p<0,05$, Figura 4).

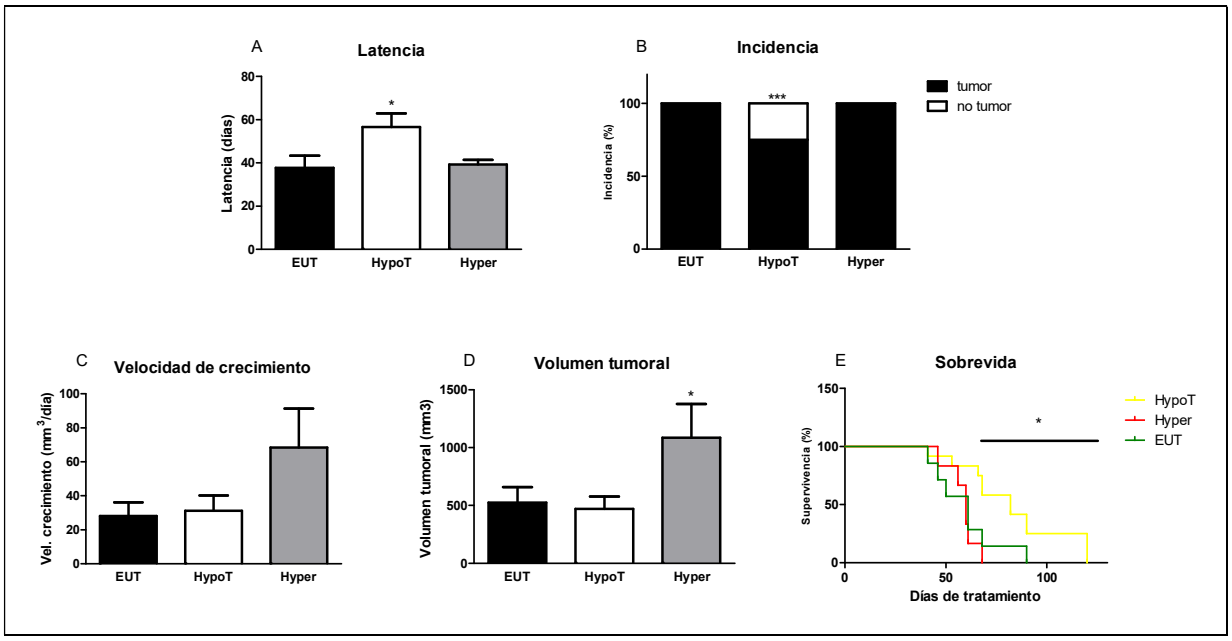


Figura 2. Incidencia, latencia y progresión de los tumores prostáticos.

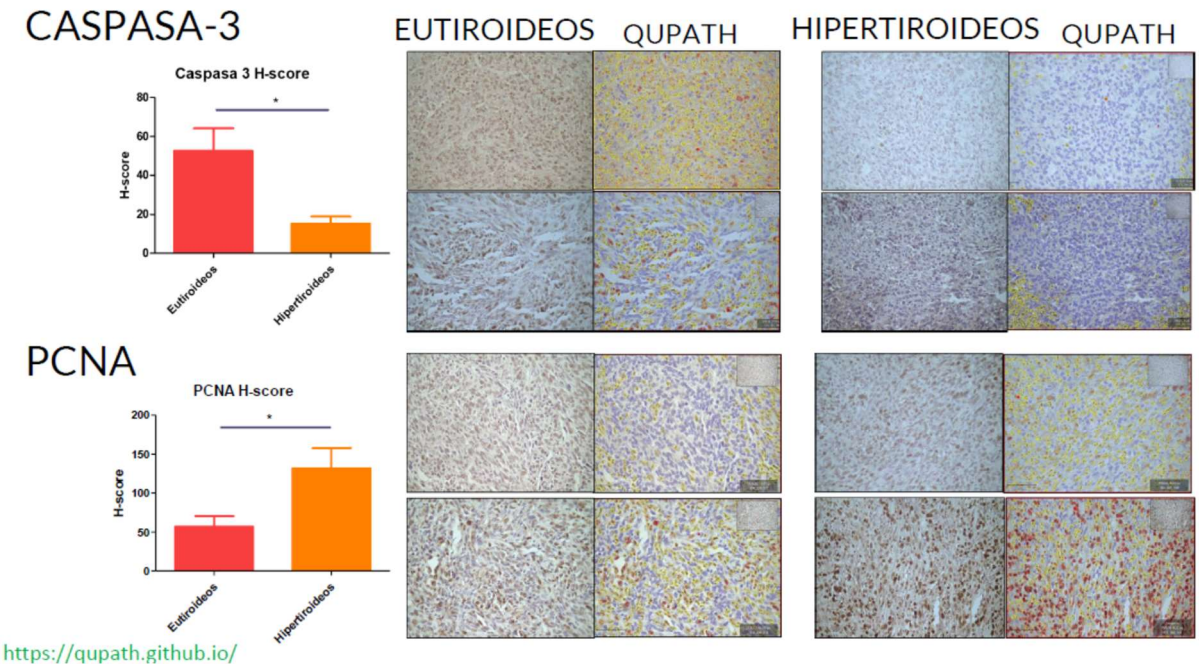


Figura 3. Inmunotinción de Caspasa 3 y PCNA en tumores de ratones hiper- y eutiroideos.

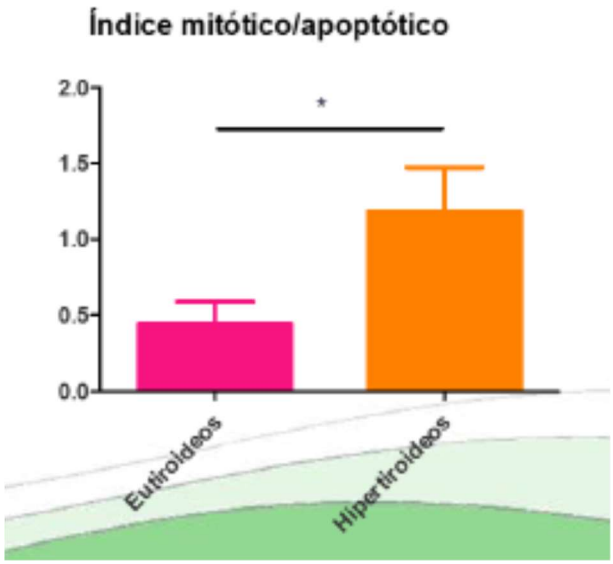


Figura 4. Índice mitótico/apoptótico en tumores de ratones hiper- y eutiroideos.

Los resultados obtenidos de la concreción del objetivo específico 1 permiten concluir que el hipotiroidismo experimental disminuye la incidencia de tumores prostáticos, aumenta la latencia de aparición de los mismos y alarga la sobrevida de los ratones. Contrariamente, el hipertiroidismo aumenta la velocidad de crecimiento de dichos tumores inhibiendo la apoptosis y potenciando la proliferación celular.

Objetivo Específico 2. Analizar los cambios genómicos y no genómicos producidos por las HT en explantos de tumores de próstata humanos y determinar su interacción con esteroides sexuales en estos efectos. (Estado de avance estimado: 30%).

Hemos recolectado 4 muestras de biopsias prostáticas ecodirigidas de CaP y 3 de tejido prostático benigno, que se incubaron durante 24h y se procesaron para estudiar la expresión de caspasa 3 (marcador de apoptosis) y PCNA (marcador de proliferación) por de inmunohistoquímica.

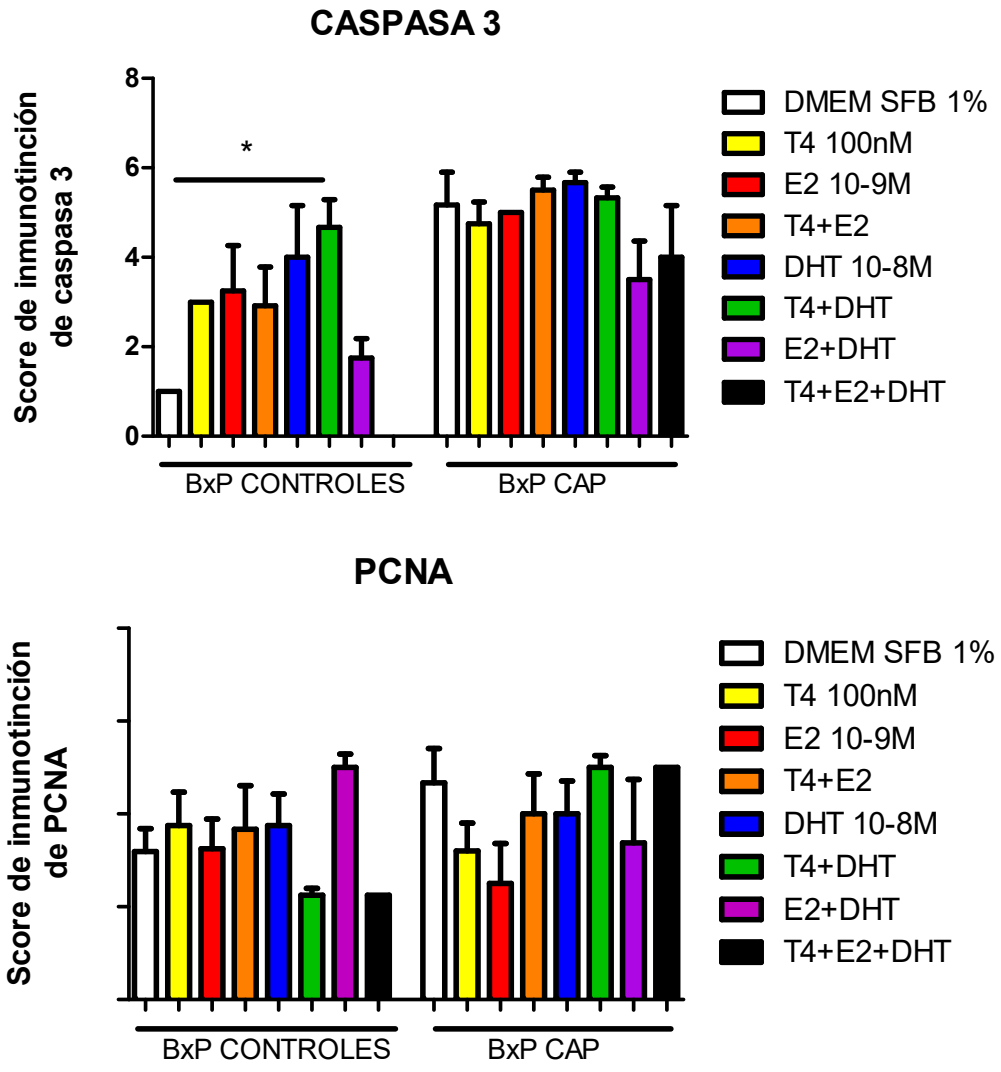


Figura 5. Inmunotinción de Caspasa 3 y PCNA en biopsias prostáticas (BxP) de tejido normal (controles) y tumoral (CaP).

Objetivo 3. Estudiar los efectos genómicos y no genómicos directos de las HT sobre la proliferación, adhesión y migración de células epiteliales tumorales prostáticas e indirectos alterando aquellos propios de los esteroides sexuales.

(Estado de avance estimado: 100%). Hemos estudiado los efectos del tratamiento con T4, solo o combinado con E2 y DHT, sobre la proliferación, viabilidad, adhesión y migración de líneas celulares tumorales prostáticas humanas:

Actividad biológica de la T4.

El tratamiento con T4 no modificó la proliferación celular en las células LnCaP (AR +) a 24hs ni a 6 días (Figura 6 A y D). Sin embargo, disminuyó significativamente la proliferación de las líneas celulares DU145 y PC3, ambas AR (-), tanto a 24h como a 6 días (Figura 6 B, C, E y F). El tratamiento tiroideo no alteró la viabilidad celular en ninguna de las líneas tumorales (Figura 6 G-I).

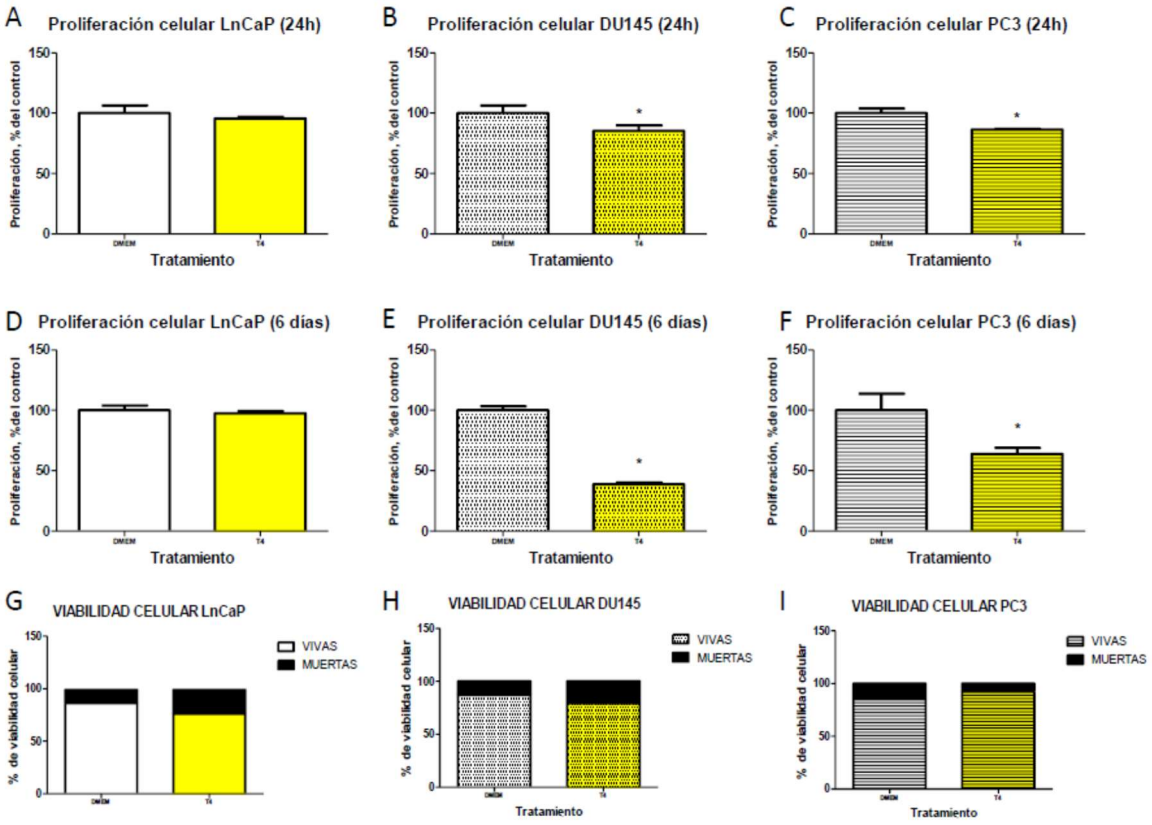


Figura 6. Efecto del tratamiento con T4 sobre la proliferación y viabilidad celular.

Además, la administración de T4 redujo la adhesión y favoreció la migración de las células LnCaP (Figura 7 A y D); mientras que no se observaron efectos significativos sobre la adhesión en las células DU145 y PC3 (Figura 7 B y C). No obstante, la T4 retrasó la migración celular de las células PC3 (Figura 7 F).

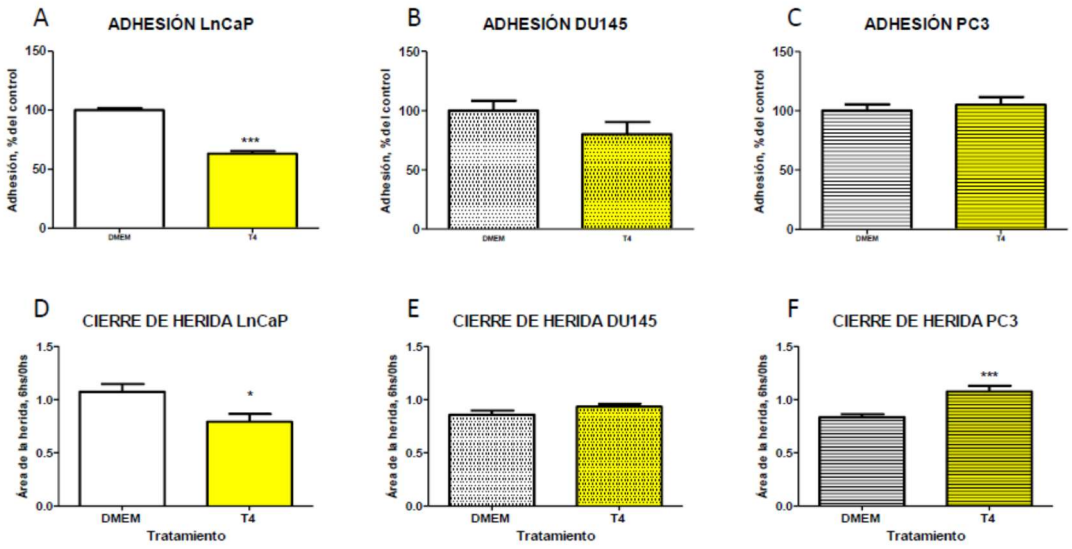


Figura 7. Efecto del tratamiento con T4 sobre la adhesión y migración celular.

Actividad biológica de la T4 y E2.

El E2 aumentó la proliferación celular de las LnCaP a 24hs y 6 días (Figura 8 A y D) y favoreció la viabilidad celular de las LnCaP (Figura 8 G). No obstante, el tratamiento combinado con T4 inhibió dichos efectos. La administración conjunta de E2 y T4 disminuyó la proliferación, la viabilidad y la adhesión de las células DU145 (Figura 8 B, E y H; Figura 7 B). Con respecto a PC3, el E2 incrementó la proliferación solo a 24hs y, nuevamente, fue inhibido por el tratamiento combinado con T4 (Figura 8 C). Finalmente, la administración de E2 y la T4 por separado retrasaron la migración de las células DU145 y PC3, respectivamente (Figura 9 B y F).

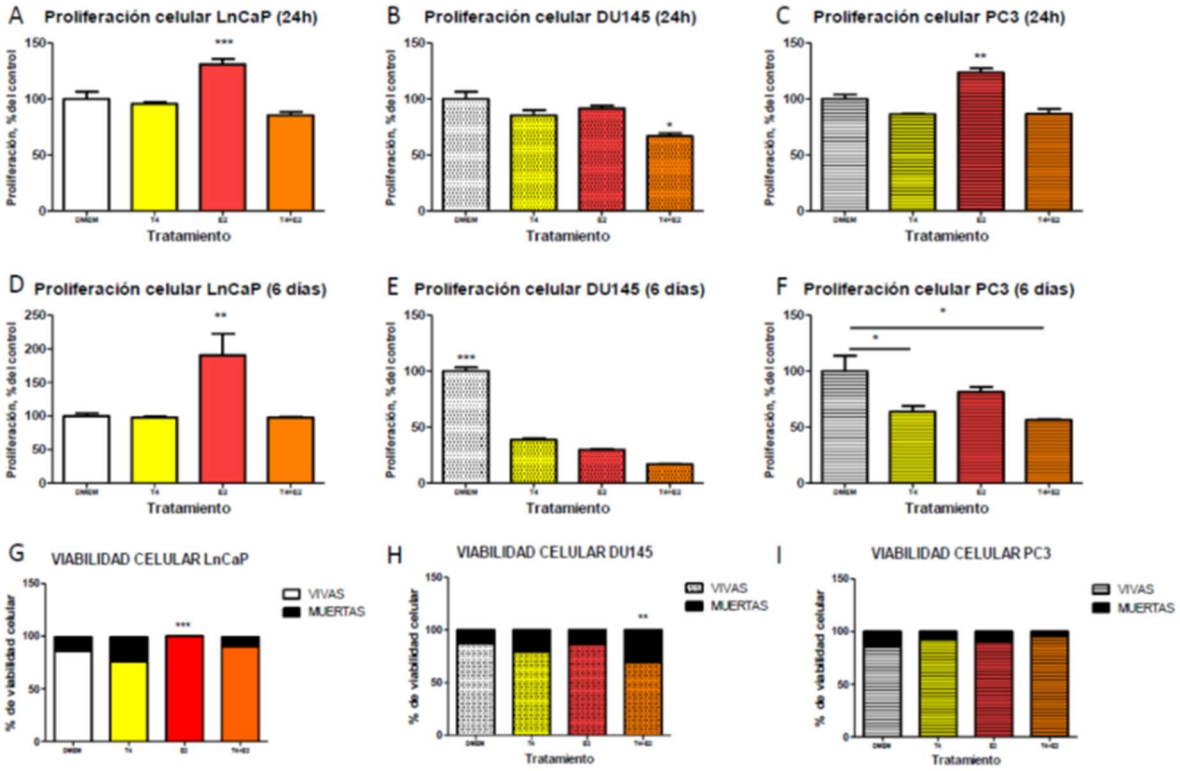


Figura 8. Efecto del tratamiento con E2, solo o combinado con T4, sobre la proliferación y viabilidad celular,

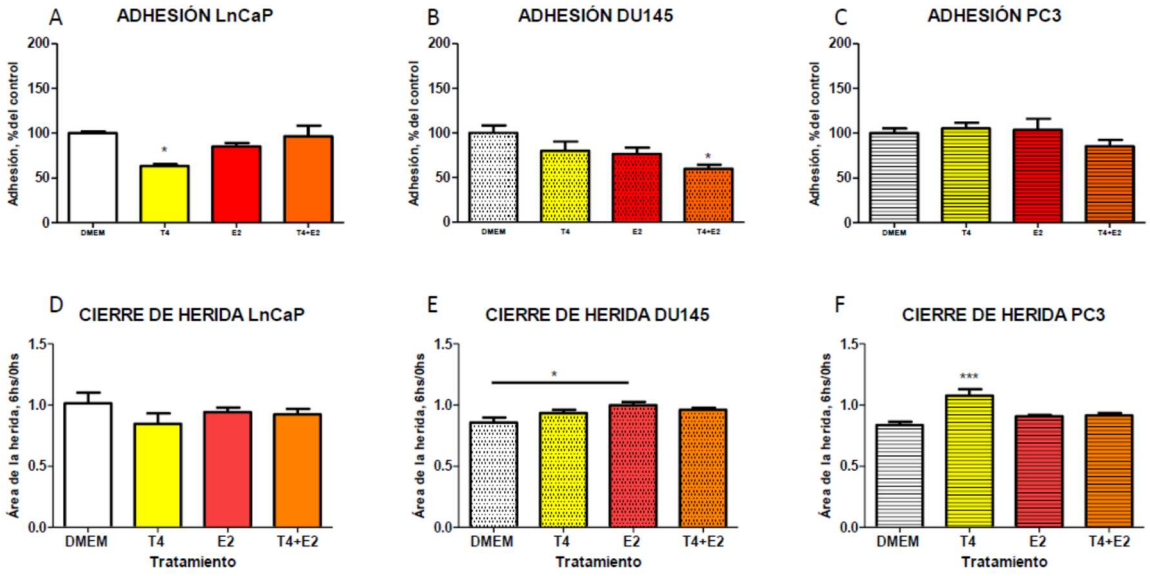


Figura 9. Efecto del tratamiento con E2, solo o combinado con T4, sobre la adhesión y migración celular,

Actividad biológica de la T4 y DHT.

El tratamiento con DHT disminuyó significativamente la proliferación a 24h y 6 días (Figura 10 B y E), y la adhesión de las células DU145 (Figura 10 B). La administración conjunta de DHT y T4 aumentó la proliferación de las células LnCaP a los 6 días (Figura 10 D) e inhibió el efecto antiproliferativo de ambas hormonas por separado en las células DU145 a los 6 días (Figura 10 E). Además, la DHT, sola o combinada con T4, disminuyeron la adhesión de las DU145 (Figura 11 B) sin cambios significativos en la migración celular. Con respecto a la PC3, la DHT, sola y combinada con T4, aumentaron la viabilidad celular de las células (Figura 10 I).

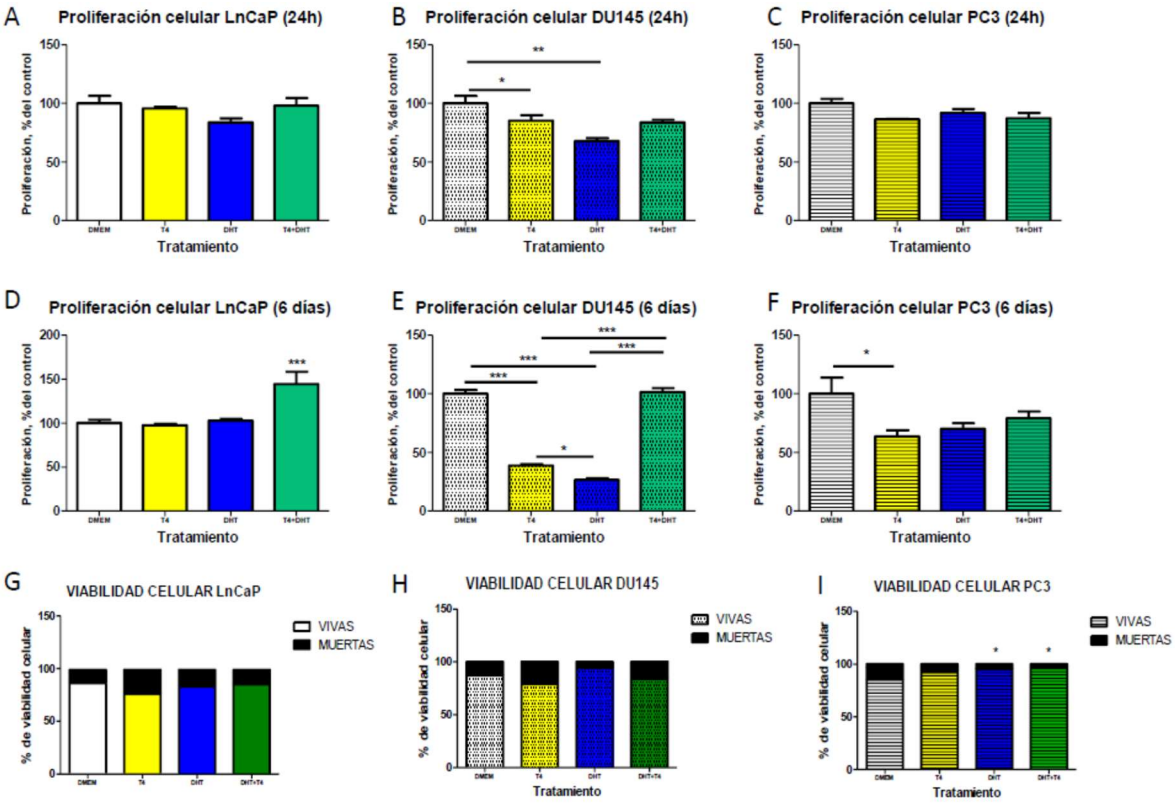


Figura 10. Efecto del tratamiento con DHT, sola o combinada con T4, sobre la proliferación y viabilidad celular.

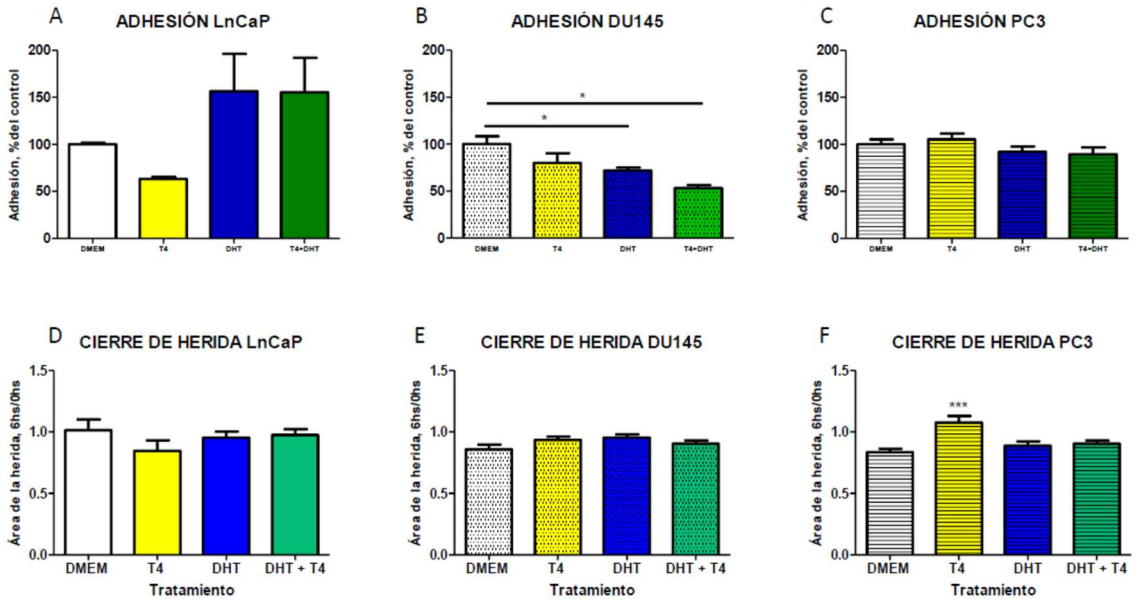


Figura 11. Efecto del tratamiento con DHT, sola o combinada con T4, sobre la adhesión y migración celular.

Los resultados del objetivo específico 3 nos permiten concluir que:

- la T4 disminuye la proliferación de las células tumores AR negativas, DU145 y PC3. Además, reduce la adhesión y promueve la migración de las células AR positivas, LnCaP.
- El tratamiento con E2 favorece la proliferación y viabilidad de las células LnCaP y PC3; y su combinación con T4 inhibe dichos efectos.
- El tratamiento conjunto de E2 y T4 retarda la proliferación, viabilidad y adhesión celular de las células DU145.
- La concentración de DHT utilizada no induce proliferación en ninguna de las líneas celulares, mientras que la administración combinada de DHT y T4 estimula la proliferación y adhesión de las células LnCaP.

CONCLUSIÓN GENERAL

El hipotiroidismo experimental disminuye la incidencia de tumores prostáticos, aumenta la latencia de aparición de los mismos y alarga la sobrevida de los ratones. Contrariamente, el hipertiroidismo aumenta la velocidad de crecimiento de dichos tumores inhibiendo la apoptosis y potenciando la proliferación celular. La administración de T4 ejercería un efecto dual, dependiente de la expresión del AR, en la carcinogénesis prostática ya que promueve la capacidad invasiva de las células AR positivas, LnCaP, e inhibe la proliferación de las líneas celulares AR negativas, DU145 y PC3. El tratamiento con E2 favorece la proliferación y viabilidad de las células tumorales prostáticas independientemente de su expresión de receptores hormonales; y la combinación de E2 y T4 inhibe dichos efectos. La DHT no induce proliferación en ninguna de las líneas celulares, mientras que la administración combinada de DHT y T4 estimula la proliferación y adhesión de las células LnCaP.

Los resultados han sido presentados en los siguientes eventos científicos:

- Rey LS, Ginevro P, Gómez S, Cano R, Santiano F, López Laur JD, Mackern JP, Sánchez V, López Fontana C, Carón RW. Hyperthyroidism affects prostate carcinogenesis in mice. XXXIX Reunión científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. 6 y 7 de diciembre, 2021.
- Rey L, Cano R, López Fontana JR, Zyla L, Santiano F, Bruna F, Gómez S, Pistone Creydt V, López Laur JD, Carón R, López Fontana C, López Fontana G. La acción de la tiroxina, estradiol y testoterona modulan la carcinogénesis prostática in vitro. Congreso interuniversitario I+D+I Mendoza. Virtual y en Nave Universitaria Mendoza- 24 al 26 de noviembre, 2021.
- Rey Echalecu LS; Ginevro P, Sanchez V, Mackern JP, Gomez S, López Fontana G, López Fontana R, Guglielmi JM, López Laur JD, Carón RW, López Fontana CM. Influencia del hipo e hipertiroidismo sobre el desarrollo de tumores prostáticos. XXXVIII Congreso de la Confederación Americana de Urología (CAU). Buenos Aires, 2-5 de octubre de 2019.

Publicaciones:

- Rey L, Cano R, López Fontana G, López Laur JD, Carón RW, López Fontana C. Efecto del hipertiroidismo en el desarrollo del cáncer de próstata. Rev Arg Urol 85 (3): 11-18 (2020).

Manuscritos en proceso de publicación:

- Cano R, Rey L, López Fontana G, López Laur JD, Carón RW, López Fontana C. Efecto del hipotiroidismo en el desarrollo del cáncer de próstata. Archivos Españoles de Urología (enviado).
- Rey Echalecu LS; Ginevro P, Sanchez V, Mackern JP, Gomez S, López Fontana G, López Fontana R, Guglielmi JM, López Laur JD, Carón RW, López Fontana CM. Influence of hypo and hyperthyroidism on the development of prostate tumors. Prostate (enviado).

INCONVENIENTES EN EL DESARROLLO PROYECTO OCASIONADOS POR LA SITUACIÓN SANITARIA "PANDEMIA COVID 2019"

Durante el desarrollo del proyecto hemos tenido grandes dificultades para reclutar pacientes debido a la situación sanitaria "Pandemia COVID 2019" ya que se restringieron al máximo las consultas y las prácticas médicas (biopsias), y se negó el acceso de personal no esencial a las instituciones de salud. Por ende, no pudimos desarrollar completamente el objetivo 2 del proyecto. Con respecto en el objetivo 1, logramos reclutar 143 pacientes y, agregamos un modelo animal murino de CaP para determinar si los estados tiroideos se asocian al desarrollo de CaP. Los resultados pueden observarse en el punto 2.

ABSTRACT

Effects of thyroid hormones on the development of prostate cancer: interaction with sex steroid hormones.

Thyroid hormones (THs) are essential for the development of normal and tumor prostate tissue. Our aim was to characterize the pathophysiological influence and molecular mechanisms of THs on the development of prostate cancer (PCa). We developed an *in vivo* model of PCa through subcutaneous inoculation of TRAMP-C1 cells in C57BL/6 mice, to evaluate the influence of hypo- and hyperthyroidism on tumor development. Mice were divided into hypothyroid (HypoT; 0.01% 6-N-propyl-2-thiouracil -PTU- in drinking water, n=10), hyperthyroid (Hyper, subcutaneous injection of 10 µg/mice/day thyroxine; n=10) and euthyroid mice as controls (EUT; n=10). We determined the latency and progression of tumors, mitotic/apoptotic ratio, caspase 3, and PCNA expression. On the other hand, we established an *in vitro* model to study the direct effects of T4, alone or combined with estradiol (E2) and/or dihydrotestosterone (DHT), on the proliferation, viability, and migration of three human CaP cell lines: LnCaP, PC3, and DU145. We observed a higher latency and survival in HypoT mice compared to Hyper and EUT. Tumor growth rate, tumor volume, mitotic/apoptotic ratio, and PCNA immunostaining were greater, while caspase 3 expression was lower in Hyper tumors than EUT. *In vitro*,

T4 treatment did not modify cell proliferation; however, it reduced the adhesion and favored the migration of LnCaP. E2 induced a significant increase in the viability and proliferation of LnCaP. The combination of DHT, E2 and T4 promoted cell proliferation. In conclusion, hypothyroidism is a protective factor against PCa but the treatment with T4 may enhance hormone-sensitive PCa development.

PERFIL DE SENSIBILIDAD/RESISTENCIA FRENTE A COLISTINA, FOSFOMICINA Y TIGECICLINA EN AISLAMIENTOS DE ENTEROBACTERIAS PROVENIENTES DE FUENTES DE AGUA DE LA PROVINCIA DEL CHACO, ARGENTINA

Liliana Silvina Lösch, Luis Antonio Merino

Área de Bacteriología. Instituto de Medicina Regional.
Universidad Nacional del Nordeste.

Los antibióticos son un grupo particular de contaminantes ambientales emergentes que recibieron gran atención en los últimos 20 años. La gran preocupación por el uso de estos compuestos, la presencia en el ambiente y la propagación de la resistencia a los antimicrobianos se convirtió en un problema de salud mundial (1).

El uso inapropiado y abusivo de los antimicrobianos dio lugar a la alarmante situación en la que bacterias multirresistentes y genes de resistencia amenazan la efectividad del tratamiento de las infecciones. Dado que estas bacterias se asocian con una mortalidad considerable, se llegó a la necesidad de reevaluar y reintroducir algunos agentes terapéuticos ya existentes como la fosfomicina, colistina y tigeciclina para colocarlos en la lista de los pocos antibióticos de última elección para tratar infecciones causadas por bacterias resistentes a varias familias de medicamentos (2–4).

Las fuentes de agua dulce son utilizadas con distintos fines como el de consumo, irrigación, recreación o receptoras de los sistemas de tratamientos de efluentes. Son componentes muy sensibles de los ecosistemas y están sujetas al impacto de fuentes puntuales y difusas de contaminación. El abuso y/o mal uso de los antimicrobianos en humanos y veterinaria son responsables que la proliferación, prevalencia y persistencia de bacterias resistentes a estos compuestos y de genes que codifican para la misma en ambientes acuáticos se hayan transformado en una problemática global (5). Asimismo la resistencia antibiótica se puede transferir desde diferentes compartimentos ambientales, como suelo o sedimentos, hacia las fuentes de agua de bebida. Diferentes estudios demostraron la presencia de genes de resistencia como así también bacterias resistentes en agua potable y en embotelladas (5).

La preocupante epidemiología de las enfermedades infecciosas y la mortalidad estimada por resistencia a los antimicrobianos en las próximas décadas definen la urgente necesidad de identificar todos los reservorios ambientales de bacterias resistentes y genes de resistencia para completar nuestro conocimiento del ciclo epidemiológico y de la dinámica de la resistencia antibiótica en ecosistemas urbanos. Atendiendo a esta realidad la Argentina adoptó una estrategia para el control de la resistencia antibiótica en el marco de Una-Salud. Sin embargo todavía existen pocas investigaciones del impacto de esta problemática en los ecosistemas acuáticos (1,6).

Atendiendo a lo antes expuesto el objetivo del presente proyecto fue determinar la sensibilidad/resistencia frente a fosfomicina (FOS), colistina (COL) y tigeciclina (TGC) en aislamientos de enterobacterales recuperados de fuentes de agua de la provincia del Chaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente proyecto se utilizó un diseño observacional descriptivo con recolección prospectiva de datos. El muestreo fue no probabilístico por conveniencia. Las muestras se tomaron a partir de fuentes de agua superficiales (ríos y lagunas) y profundas (perforaciones y pozos) seleccionándolas en base a su ubicación con respecto a los centros urbanos y de acuerdo a la actividad antrópica por los que se ven afectados.

De cada sitio seleccionado se tomaron 500 ml de muestra en recipiente estéril los cuales se trasportaron refrigerados al laboratorio para iniciar su estudio de manera inmediata. Cien mililitros de cada muestra se sembraron en mismo volumen de caldo Lauril Sulfato doble concentración para su enriquecimiento. Luego de 24 hs de incubación a 35±2°C se realizó siembra para aislamiento en placas de agar Eosina Azul de Metileno. Tras 24 hs de incubación a 35±2°C, se identificaron las colonias mediante pruebas bioquímicas clásicas (7).

En aquellos aislamientos pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae* se evaluó el perfil de sensibilidad/resistencia frente los tres antimicrobianos por el método de difusión con discos en agar Mueller Hinton utilizando discos de FOS (200 µg), COL (10 µg) y TGC (15 µg) y se utilizaron como controles cepas de la American Type Culture Collection (ATCC), según procedimientos estandarizados (8–10). La interpretación de los resultados se realizó siguiendo recomendaciones vigentes, según se muestra en la Tabla I.

Tabla I: Puntos de corte para interpretar los resultados de las pruebas de difusión con discos.

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente	Referencia
Fosfomicina	≥ 15 mm	13-14 mm	≤ 12 mm	(11)
Colistina	≥ 14 mm	Realizar CIM	≤ 10 mm	(8)
Tigeciclina	≥ 18 mm	-	≤ 17 mm	(9)

En los aislamientos que se consideraron resistentes a FOS, COL y/o TGC en el antibiograma, se confirmó la resistencia mediante la determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) por microdilución en caldo mediante el sistema Sensititre (ThermoScientific^{MR}) de acuerdo a las especificaciones del fabricante(12). Los valores considerados para la interpretación se muestran en la Tabla II.

No se tuvieron en cuenta las resistencias intrínsecas de los aislamientos estudiados (*Proteus, Providencia, Morganella y Serratia* son naturalmente resistentes a COL; *Proteus, Providencia y Morganella* son naturalmente resistentes a TGC; *Morganella morganii* es resistente natural a FOS) [11].

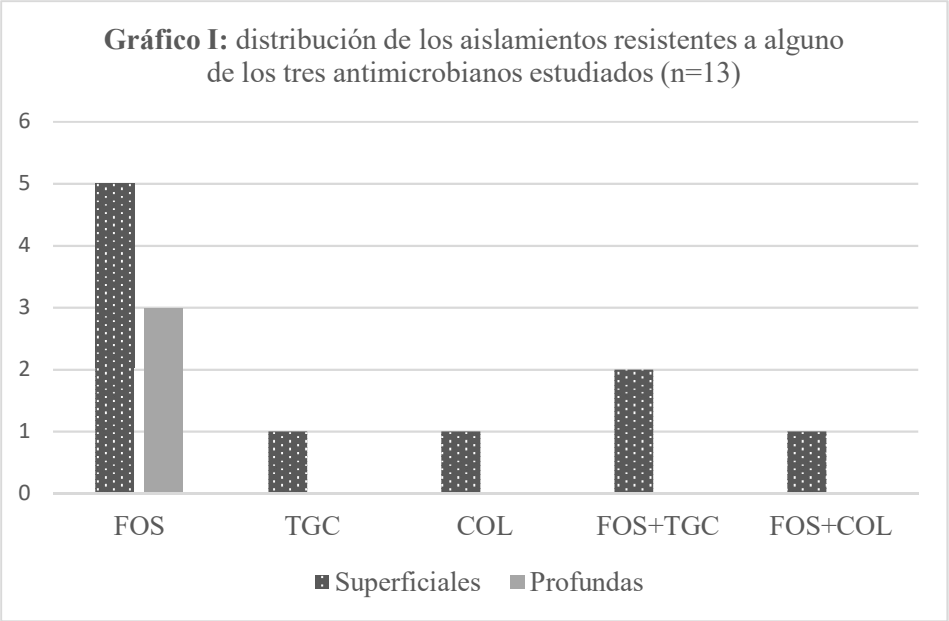
Tabla II: Puntos de corte para interpretar los resultados de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas mediante microdilución en caldo.

Antimicrobiano	**Sensible**	**Resistente**	**Referencia**
Fosfomicina	≤ 32 µg/ml	≥ 64 µg/ml	(9)
Colistina	≤ 2 µg/ml	≥ 4 µg/ml	(10)
Tigeciclina	≤ 0,5 µg/ml	≥ 1 µg/ml	(9)

RESULTADOS

Se analizaron un total de 70 muestras de agua de las cuales 40 fueron recolectadas en fuentes superficiales y 30 de aguas subterráneas de distintas localidades de la provincia a partir de las que se obtuvieron 106 aislamientos de enterobacterales (68 provenientes de fuentes superficiales y 38 de fuentes subterráneas).

En el análisis de las muestras de aguas superficiales se encontraron 10 (14,7%) aislamientos resistentes a alguno de los antimicrobianos estudiados mientras que en aguas subterráneas resultaron resistentes 3 (7,9%) aislamientos (Gráfico I).



Tal como se puede apreciar en el gráfico I en las muestras de aguas subterráneas se determinó la presencia de tres aislamientos, de diferentes orígenes, resistentes fosfomicina. En tanto que a partir de los cursos/ cuerpos de agua superficiales se recuperaron 10 aislamientos de diferentes fuentes con resistencia individual o combinada frente a algunos de los antimicrobianos ensayados. Los aislamientos resistentes desagregados de acuerdo al género y/o especie se muestran en la Tabla III.

Tabla III: Distribución de los aislamientos resistentes según el género y/o la especie involucrada

Género	FOS	TIG	COL	FOS+TIG	FOS+COL	Total
*Citrobacter*spp				1		1
*Cedecea*spp		1				1
Enterobacter cloacae	1		1			2
Escherichia coli	2				1	3
Klebsiella pneumoniae	5				1	6
Total	8	1	1	1	2	13

DISCUSIÓN

La resistencia antibiótica se ha extendido a los diferentes compartimentos del ambiente, determinándose como zonas de reserva de microorganismos resistentes y genes de resistencia las áreas las impactadas por la producción animal, la acuicultura, los basurales y las pantas de tratamientos de efluentes cloacales las que no fueron diseñadas para la remoción de antimicrobianos. La diseminación de la resistencia antibiótica desde los reservorios previamente citados hacia las fuentes de agua está impulsada por las actividades humanas y los procesos hidrogeológicos como escorrentías, infiltraciones, lixiviados y recargas de acuíferos (1,13).

Las muestras de agua subterráneas evaluadas en este trabajo correspondían a pozos y perforaciones destinadas al consumo humano por lo cual la presencia de bacterias del grupo de los coliformes las transforma en no aceptables para el consumo humano acorde a la normativa vigente en el Chaco (Código Alimentario Argentino). A su vez la presencia de bacterias resistentes a fosfomicina incrementan sustancialmente el riesgo para la salud de la población que la consume (5)(14). En la Península de Yucatán, México, Moore y col detectaron la presencia genes de resistencia a diferentes antimicrobianos, entre ellos fosfomicina, en aguas procedentes de fuentes subterráneas impactadas por la actividad humana. Genes de resistencia hacia este compuesto también fueron detectados en aguas termales en el Himalaya por el grupo de Sharma y cols (15,16). A su vez, Szekeres y col demostraron la presencia de residuos de antibióticos principalmente trimetroprima y macrólidos, genes de resistencia y elementos genéticos móviles en fuentes de agua subterráneas de Rumania destacando su presencia no sólo en áreas urbanas sino también en zonas remotas (17). El comportamiento y movilización de microorganismos resistentes, de genes que codifican resistencia como así también de los propios antimicrobianos en fuentes subterráneas requiere ampliar los estudios para comprender su dinámica en este compartimento ambiental.

A diferencia de los resultados de las fuentes subterráneas, en las superficiales estudiadas se encontraron 10 (14,7%) aislamientos resistentes a alguno de los antimicrobianos estudiados, ya sea con resistencia simple hacia alguno de los tres compuestos ensayados o combinados como en el caso de la resistencia ante FOS-COL y FOS-TGC.

Los ecosistemas acuáticos sujetos a la presión antrópica, como es el caso del vuelco de efluentes hospitalarios o la descarga de los sistemas de tratamiento de efluentes cloacales, son lugares donde se produce una rápida evolución de las comunidades microbianas y puntos críticos probables para la selección y aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, condición que podría explicar parte de los resultados de este trabajo (1,6).

Los antecedentes de vigilancia de la resistencia antibiótica bacterias provenientes de fuentes de agua de la región NEA de Argentina datan del año 2008, sin embargo en ese momento no se probó la resistencia a FOS, COL y TGC(18). Por su parte, en diversos países se estudió la presencia de bacterias resistentes en medios acuáticos pero en muy pocos se focalizó el estudio sobre esos tres antimicrobianos, sino que se buscaron bacterias resistentes a drogas de uso común en clínica humana (17,19).

De los tres antimicrobianos ensayados en los aislamientos de los cursos/cuerpos de agua superficiales hacia el que evidenció el mayor porcentaje de resistencia fue FOS (84,6%), ya sea de manera individual o combinada con alguno de los otros compuestos (n=11/13) (Tabla III). Si bien no existen muchos reportes en lo que respecta a enterobacterias resistentes a FOS en muestras de agua Biggel y cols reportan 13 aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a este compuesto y portadores de plásmidos que codifican la resistencia en muestras ambientales de Suiza, al tiempo que Kappell y cols encontraron entre un 17% y un 48% de aislamientos de *E. coli* resistentes a FOS en muestras provenientes de agua de puertos y efluentes en Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos (20,21) En relación a COL se recuperaron tres aislamientos resistentes a este compuesto en tres microorganismos diferentes *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. A su vez, Fernandes y col. recuperaron 3 aislamientos de *E. coli* resistentes a COL a partir de 11 muestras de agua de mar en Brasil y en el trabajo de Drali y col. se recuperaron solo dos aislamientos resistentes a partir de 152 muestras de agua de mar de 62 playas de Argelia, resultados que deberían resaltar la importancia de las aguas de uso recreacional como reservorios medioambientales de bacterias resistentes en sitios con elevado recambio turísticos. COL se considera actualmente como uno de los antibióticos de "último recurso" que se utiliza para el tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos gramnegativos multirresistentes, de allí la relevancia de la vigilancia ambiental de este compuesto (22,23). Finalmente en lo referente a TGC se recuperaron dos aislamientos resistentes a este compuesto. Los informes sobre enterobacterias resistentes a TGC se presentan con respecto a entornos médicos, pero son raros los relacionados con el medio ambiente, uno de ellos es el informe de dos aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a TGC recuperados del río Mura en Graz, Austria (24).

Los hallazgos propios y los publicados por otros autores en fuentes de agua subterráneas y superficiales resaltan la gran variación en la frecuencia de aparición de aislamientos resistentes a COL, FOS y TGC, lo que está influenciado principalmente por las actividades antrópicas y las características geográficas de cada sitio de muestreo.

CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo la detección de enterobacterales resistentes a FOS, COL y TGC en ambientes acuáticos subterráneos y superficiales de la provincia del Chaco. Microorganismos resistentes a uno o combinación de los antimicrobianos ensayados se detectaron en ambas fuentes. Si bien el número de aislamientos resistentes encontrados es bajo su sola presencia debe alertar sobre el posible pasaje de este tipo de bacterias desde el ambiente al hombre, considerando al agua como un reservorio y medio de transmisión.

La identificación de reservorios ambientales de bacterias resistentes, genes que codifican resistencia como así también de antimicrobianos y sus metabolitos contribuye al entendimiento de la epidemiología de estos patógenos a la vez que permite evaluar, localmente, en qué situaciones deben extremarse las medidas para prevenir la diseminación de la multirresistencia, contribuyendo de esta manera a la vigilancia ambiental de la resistencia antibiótica en el marco de una salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valdés ME, Santos LHMLM, Rodríguez Castro MC, Giorgi A, Barceló D, Rodríguez-Mozaz S, et al. Distribution of antibiotics in water, sediments and biofilm in an urban river (Córdoba, Argentina, LA). Environ Pollut. 2021;269.
2. Shi X, Xia Y, Wei W, Ni B. Accelerated spread of antibiotic resistance genes (ARGs) induced by non-antibiotic conditions : Roles and mechanisms. Water Res. Elsevier Ltd; 2022;224(June):119060.
3. Greer ND. Tigecycline (Tygacil): The First in the Glycylcycline Class of Antibiotics. Baylor Univ Med Cent Proc. 2006;19(2):155–61.
4. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. Clin Microbiol Infect. Elsevier Ltd; 2015;21(10):899–905.
5. Sanganyado E, Gwenzi W. Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. Sci Total Environ. Elsevier B.V.; 2019;669:785–97.
6. Almakki A, Jumas-Bilak E, Marchandin H, Licznar-Fajardo P. Antibiotic resistance in urban runoff. Sci Total Environ. Elsevier B.V.; 2019;667:64–76.
7. APHA AWWA WEF. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20a. Eaton A, Clesceri L, Rice E, Greenberg A, editors. Washington D.C.: American Public Health Association; 2005. 2671 p.
8. Red Whonet-Argentina. Protocolo de Trabajo Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos [Internet]. 2020. Available from: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2020/07/Protocolo-WHONET-aprobado-2020-final-2.pdf
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0 [Internet]. 2019. Available from: www.eucast.org/clinical_breakpoints
10. Clinical and LaboratoryStandards Institute. Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing - 32th Ed. Suppl M100. 2022 [Internet]. Available from: http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED32:2022&scope=user
11. Pasteran F, Lucero C, Rapoport M, Guerriero L, Barreiro I, Albornoz E, et al. Tigecycline and intravenous fosfomycin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae. J Infect Dev Ctries. 2012;6(5):452–6.
12. ANMAT. Disposición No1313 [Internet]. 2015. Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/febrero_2015/Dispo_1313-15.pdf
13. Gwenzi W, Musiyiwa K, Mangori L. Sources, behaviour and health risks of antimicrobial resistance genes in wastewaters: A hotspot reservoir. J Environ Chem Eng. Elsevier B.V.; 2020;8(1).

14. Administración Nacional de Medicamentos A y TM. Capítulo XII- Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificada. [Internet]. Buenos Aires; 2007. Available from: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf
15. Moore A, Lenczewski M, Leal-Bautista RM, Duvall M. Groundwater microbial diversity and antibiotic resistance linked to human population density in Yucatan peninsula, Mexico. Vol. 66, Canadian Journal of Microbiology. 2020. p. 46–58.
16. Sharma N, Kumari R, Thakur M, Rai AK, Singh SP. Molecular dissemination of emerging antibiotic, biocide, and metal co-resistomes in the Himalayan hot springs. Vol. 307, Journal of Environmental Management. 2022.
17. Szekeres E, Chiriac CM, Baricz A, Szőke-Nagy T, Lung I, Soran ML, et al. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. Environ Pollut. 2018;236:734–44.
18. Lösch L, Alonso J, Merino L. Occurrence of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in water from different sources in a subtropical region of Argentina Ocorrência de Enterobacteriaceae resistentes aos antimicrobianos nas águas de diferentes fontes em uma região subtropical de Arge. Rev Ambient Agua. 2008;3(2):28–36.
19. Su HC, Liu YS, Pan CG, Chen J, He LY, Ying GG. Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system: From drinking water source to tap water. Sci Total Environ. Elsevier B.V.; 2018;616–617:453–61.
20. Biggel M, Zurfluh K, Treier A, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of fosA-carrying plasmids in E. coli and Klebsiella spp. isolates originating from food and environmental samples. J Antimicrob Chemother. 2021;76(8):2004–11.
21. Kappell AD, De Nies MS, Ahuja NH, Ledeboer NA, Newton RJ, Hristova KR. Detection of multi-drug resistant Escherichia coli in the urban waterways of Milwaukee, WI. Front Microbiol. 2015;6(APR):1–12.
22. Miriam F, Fábio S, Fernanda E, Caetano S, Louise C, Nilton. L. Colistin-Resistant mcr-1-Positive Escherichia coli on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(7):7–10.
23. Drali R, Berrazeg M, Zidouni LL, Hamitouche F, Abbas AA, Deriet A, et al. Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from seawater. Sci Total Environ. The Authors; 2018;642:90–4.
24. Hladicz A, Kittinger C, Zarfel G. Tigecycline resistant Klebsiella pneumoniae isolated from Austrian river water. Int J Environ Res Public Health. 2017;14(10):11–3.

ABSTRACT

Freshwater sources are very sensitive components of ecosystems, are subject to the impact of point, and diffuse sources of pollution. The abuse and/or misuse of antimicrobials in humans and veterinary medicine are responsible for the proliferation, prevalence and persistence of bacteria resistant to these compounds and of genes that code for it in aquatic environments that have become a global problem.

The objective of this project was to determine the sensitivity/resistance against fosfomycin (FOS), colistin (COL) and tigecycline (TGC) in Enterobacterales isolates recovered from water sources in the province of Chaco.

The samples were taken from surface water sources (rivers and lagoons) and deep water sources (perforations and wells), they were inoculated in double concentration Lauryl Sulfate broth for enrichment. Sowing was then carried out for isolation on Methylene Blue Eosin agar plates. Colonies were identified by classical biochemical tests. The sensitivity/resistance profile against FOS, COL and TGC was evaluated by the disk diffusion method on Mueller Hinton agar. In the isolates that were considered resistant in the antibiogram, resistance was confirmed by determining the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) by microdilution.

Seventy water samples were analysed, of which 40 were collected from surface sources and 30 from groundwater, from which 106 Enterobacterales isolates were obtained. In the analysis of surface water samples, 10 (14.7%) isolates were found to be resistant to some of the antimicrobials studied, while 3 (7.9%) isolates were found to be resistant in groundwater.

The identification of environmental reservoirs of resistant bacteria, genes that encode resistance, antimicrobials and their metabolites contributes to the understanding of epidemiology and to local evaluation in which situations measures should be taken to prevent the spread of multi-resistance, thus contributing to environmental surveillance of antibiotic resistance in the framework of One Health.

ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ZONAS EXPUESTAS A ARSÉNICO Y FLÚOR EN EL AGUA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA Y DETERMINACIÓN DEL TIPO DE AGUA (POZO, RED, ÓSMOSIS INVERSA, EMBOTELLADA, ETC.) QUE CONSUME LA POBLACIÓN

Maela Lupo

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

Cabe aclarar que hacia el final de la realización de este proyecto se inició la emergencia sanitaria debido a la pandemia por COVID 19, donde tuvimos que aislarnos, lo cual llevó a un atraso en los tiempos estipulados (argentinasalud, 2022). Igualmente, el proyecto continuó posteriormente para poder dar cumplimiento a los objetivos planteados.

Hasta el momento se cuentan con 450 muestras de agua de diferente origen (pozo, red, ósmosis inversa y envasada) provenientes de diferentes puntos de la República Argentina. A dichas muestras se les realizaron determinaciones de arsénico y fluoruro.

El contenido de arsénico se determinó por medio del tratamiento de la muestra con zinc, ácido clorhídrico, ioduro de potasio y cloruro estanioso, reduciendo el As a (-III) y generando arsina en un dispositivo cerrado (Lupo, 2020). La misma es captada en un tubo que contiene una solución de dietilditiocarbamato de plata disuelto en piridina, que reacciona con la arsina generando un compuesto coloreado que se lee espectrofotométricamnete a 540 nm.

El fluoruro se midió utilizando un electrodo de ión específico, donde los milivoltios generados son proporcionales al logaritmo de la concentración, la curva realizada fue de 0 a 8 ppm (Rigalli, 2007).

Para evaluar la asociación, relación y/o interacción entre los diferentes componentes tóxicos del agua, como para el registro, almacenamiento y análisis de los valores se utilizó el software R (R core team, 2022). En dicha plataforma se creó un software de diseño propio, denominado ATLANTIS, en el cual se encuentran los valores de todas las determinaciones, sus controles de calidad y el registro de cada muestra. En cada determinación se realizó una curva de calibración correspondiente a la medición y se procesaron soluciones controles de calidad (QC) y análisis de adición –recuperación.

OBJETIVOS

- Identificar niveles de presencia de flúor y arsénico en agua potable en distintas áreas rurales y urbanas de la República Argentina y su incidencia en la salud pública.

- Evaluar la cantidad de personas que consumen agua de distintas fuentes: red, pozo, ósmosis inversa y embotellada.

RESULTADOS

Las muestras analizadas se muestran como media desvió estándar y presentan una concentración de As: 19.52±25.66 con una mediana: 11.85 y un rango de 0-220.74 ppb y de F: 0.78±0.77, con una mediana de 0.55 y un rango de 0.03-5.45 ppb. Dichos valores se observan gráficamente en la Ilustración 1. Como se observa en los valores encontrados en relación al As más del 50% de las muestras analizadas no cumplen con la recomendación de la OMS o con los valores permitidos del CAA (WHO, 2011 y Capitulo XII, 2007). En relación al F el porcentaje es de 35% mucho menor que el de As.

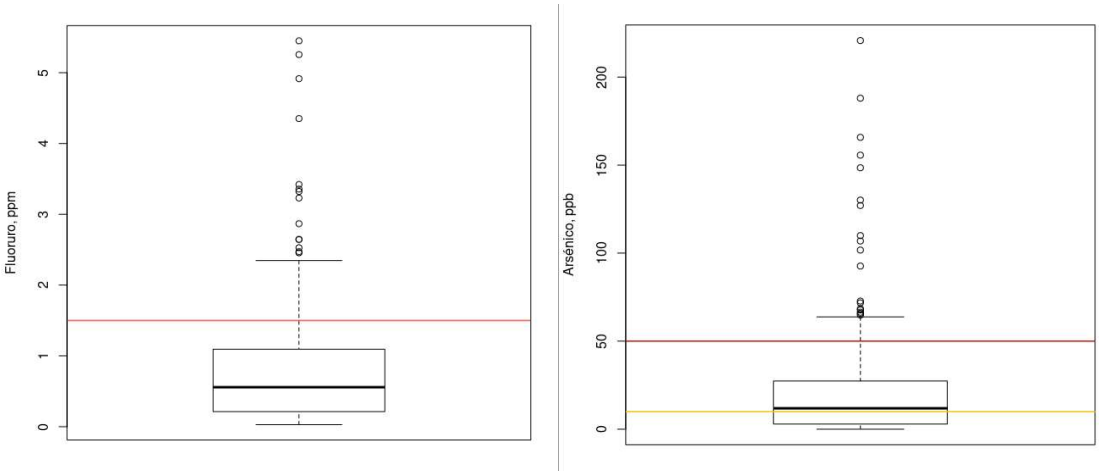


Ilustración 1: A la izquierda se observa la gráfica de fluoruro, la línea roja indica el valor máximo permitido por la ley, que es 1.5 ppm (CAA y OMS). A la derecha se observa la gráfica de arsénico, la línea naranja indica el valor máximo recomendado por la OMS y el CAA, y la línea roja indica el valor máximo obligatorio permitido por la ley provincial de Santa Fe. Ambos gráficos son de cajas y bigotes, donde el extremo inferior de la caja es el percentilo 25% y el extremo superior el percentilo 75%, las líneas horizontales indican el rango de datos.

Se analizaron las muestras de agua según origen de las mismas, ya sea pozo, red, ósmosis inversa o envasada. Los valores obtenidos se observan en la Tabla 1, cuando se compararon las concentraciones de As según el origen del agua se obtuvieron diferencias significativas entre las aguas de red, pozo y osmosis inversa y envasada, a mayor procesamiento del agua menor concentración de As, como era de esperar. Lo mismo se observó con las concentraciones de F (ANOVA, $p<0.05$). En la tabla se expresan diferencias significativas con letras diferentes, entre las concentraciones de As según el origen de la muestra, lo mismo se observa para las concentraciones de F.

Tipo de agua	Arsénico mediana (rango), ppb	Fluoruro mediana (rango), ppm	n
red	13.0 (0-165.8)a	0.55 (0.05-3.23)a	241
pozo	16.65 (0-220.74)b	0.71 (0.075-5.45)b	171
Ósmosis inversa	4.56 (0-21.97)c	0.15 (0.03-0.38)c	18
envasada	3.14 (0-31.3)c	0.27 (0.05-1.19)c	20

Tabla 1: Se muestran los valores de arsénico y fluoruro según el origen del agua, se expresan en mediana y rango. También, se puede observar el número de muestras analizadas por tipo de agua (n). Se realizó análisis estadístico, observándose diferencias significativas entre los tipos de agua, ANOVA $p<0.05$, letras diferentes expresan diferencias significativas, LSD.test, $p<0.05$.

Para determinar si la población en general consume agua de pozo, red, ósmosis inversa, envasada, etc, entre otras cuestiones se diseñó una encuesta, la cual fue distribuida online para poder acceder al mayor número de personas posibles. A la encuesta realizada se puede acceder mediante el siguiente link:

https://docs.google.com/forms/d/1kJn-wbbWqfVyy0HsvtFuf_uHZhYM0k5Oi0NEX5ZUdbc/edit

Con un total de 630 personas que realizaron la encuesta se muestran los siguientes resultados:

Se consultó sobre el tipo de agua consumida y los encuestados respondieron en relación a si consumen agua de pozo, red, ósmosis inversa o envasada. En la Ilustración 2 se observan los siguientes datos: un 67 % de los encuestados consumen agua de red, 19% envasada, 4 % pozo y 8 % ósmosis inversa.

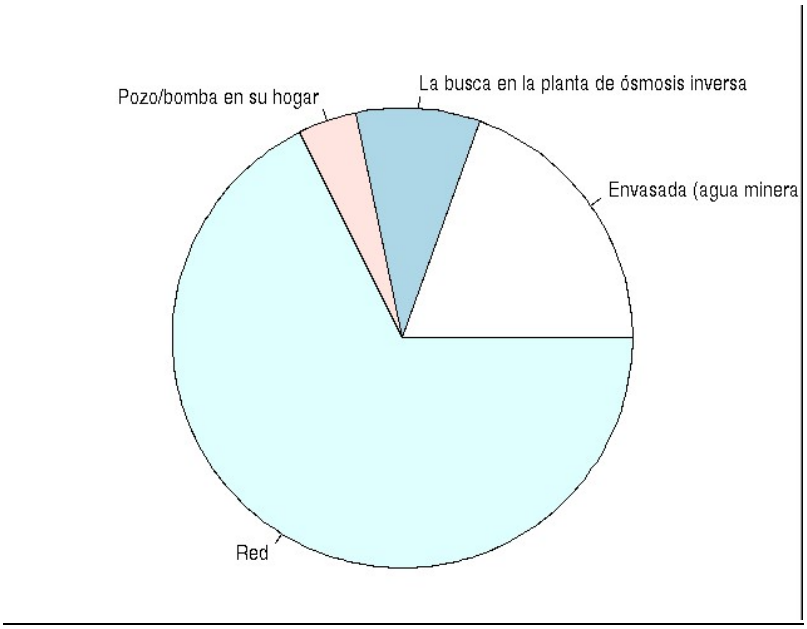


Ilustración 2: Gráfico de torta en el cual se observan los datos de origen del agua consumida por la población entrevistada.

Se evaluó si consideraban adecuado el costo del agua envasada:

Observamos en la ilustración 3 que de las personas encuestadas, el 27.6% no consume agua envasada, el 20% considera que su valor es adecuado, el 0.47 % que es bajo y un 49.8% considera que es elevado, hay un 2.06 % que no sabe.

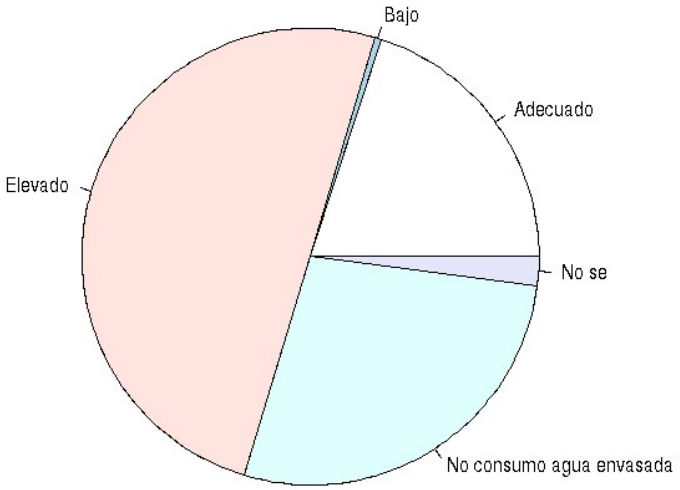


Ilustración 3: Gráfico de torta con los resultados de la evaluación del consumo de agua envasada.

Para realizar un análisis regional se seleccionaron las provincias de las cuales se tiene mayor número de muestras, y así realizar un análisis más representativo. Las provincias son las siguientes: Buenos Aires (n=103), Santa Fe (n=229), Entre Ríos (n=19), La Pampa (n=65) y Córdoba (n=20). Los valores de As y F de dichas provincias se pueden visualizar en la tabla 2, como mediana (rango).

Provincia	Arsénico mediana (rango), ppb	Fluoruro mediana (rango), ppm
Buenos Aires	8.28 (0-130.12)	0.64 (0.07-5.44)
Santa Fe	13.92 (0-220.74)	0.45 (0.028-2.64)
Entre Ríos	3.92 (0-44.60)	0.14 (0.05-0.5)
La Pampa	27.54 (0-68.42)	1.79 (0.30-4.35)
Córdoba	3.05 (0- 39.49)	0.31 (0.21-2.12)

Tabla 2: Valores de arsénico y fluoruro expresados en mediana y rango, de las diferentes provincias analizadas.

Como podemos observar la provincia de La Pampa es la que posee una mediana con concentraciones superiores de As y F de las recomendadas por la OMS. La provincia de Santa Fe tiene una mediana que supera a lo recomendado por la OMS en relación al As, y a su vez tiene los mayores valores encontrados en el muestreo, valores de As de hasta 220 ppb. Estos valores superan más de 20 veces los valores recomendados por la OMS. En relación al F si bien la mediana se encuentra dentro de los valores recomendados, se han encontrado valores de hasta 2.64 ppm, superando lo recomendado por la OMS. En relación a la provincia de Buenos Aires encontramos que la mediana de los valores de As medidos esta por debajo del valor recomendado por la OMS, pero se han encontrado muestras de hasta 130 ppb, superando ampliamente el valor de 10 ppb. Con respecto al F si bien la mediana de las muestras es menor que el valor recomendado, el valor máximo de F encontrado se registró en esa provincia siendo 5.44 ppm, más del doble del valor recomendado. Las provincias de Entre Ríos y Córdoba registran valores mucho menores que las otras provincias, cabe destacar que el número de muestras de esas provincias es mucho menor. Y hay algunas muestras que superan a los límites recomendado por la OMS.

Se seleccionaron 104 muestras que pertenecen a distintas ciudades de las provincias analizadas y se analizó la relación fluoruro/arsénico (F/As) de esas muestras.

El análisis de los datos permitió delimitar 5 regiones con diferente proporción F/As:

Zona 1 (General pico) proporción F/As = 62

Zona 2: Santa Regina F/As = 155

Zona 3 Cañada de Ucle F/As: 12

Zona 4 Rosario F/As: 54

Zona 5 Villa Cañas F/As: 21

En la siguiente tabla se puede observar la región analizada, la concentración de fluoruro, de arsénico, la cantidad de muestras analizadas y la relación fluoruro/arsénico de cada región.

Localidad	F, ppm (mediana)	As, ppm (mediana)	n	F/As
Santa Regina	0,7	0,0045	23	155
General Pico	1,81	0,029	60	62
Cañada de Ucle	1,05	0,082	4	12
Rosario	0,13	0,0024	14	54
Villa Cañas	1,26	0,059	3	21

Tabla 3: Valores de As y F de diferentes ciudades de la República Argentina y la relación diferencial F/As de cada una.

Como podemos observar en la tabla hay diferentes relaciones F/As en las distintas ciudades analizadas de nuestro país. A su vez, el resto de los componentes del agua podrían estar influyendo sobre estas relaciones y afectar de forma diferencial sobre la salud de la población. Por lo cual se evaluarán el resto de los componentes del agua y su relación con las diferentes proporciones F/As.

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Como se observa en los valores encontrados en relación al As más del 50% de las muestras analizadas no cumplen con la recomendación de la OMS o con los valores permitidos del CAA. En relación al F el porcentaje es de 35%. Cuando se compararon las concentraciones de As según el origen del agua se obtuvieron diferencias significativas entre las aguas de red, pozo y osmosis inversa y envasada (no se hallaron diferencias entre las dos últimas). Lo mismo se observó con las concentraciones de F. Indicando que a mayor procesamiento o purificación del agua, menor concentración de As y/o F tiene la muestra. De los datos de la encuesta realizada en relación al consumo de agua de la población podemos concluir que solo un 67% de la población encuestada consume agua de red, que es la provista por la ciudad en la cual habitan. Este bajo consumo no estaría relacionado con la calidad del agua consumida sino con otros factores más sociales. De la población que consume agua envasada un 49.8% considera que el precio de la misma es alto. Del análisis regional concluimos que La Pampa es la provincia que posee una mediana con concentraciones superiores de As y F de las recomendadas por la OMS. La provincia de Santa Fe tiene una mediana que supera a lo recomendado por la OMS en relación al As, y a su vez tiene los mayores valores encontrados en el muestreo, valores de As de hasta 220 ppb. Estos valores superan más de 20 veces los valores recomendados por la OMS. En relación al F si bien la mediana se encuentra dentro de los valores recomendados, se han encontrado valores de hasta 2.64 ppm, superando lo recomendado por la OMS. En relación a la provincia de Buenos Aires encontramos que la mediana de los valores de As medidos esta por debajo del valor recomendado por la OMS, pero se han encontrado muestras de hasta 130 ppb, superando ampliamente el valor de 10 ppb. Con respecto al F si bien la mediana de las muestras es menor que el valor recomendado, el valor máximo de F encontrado se registró en esa provincia siendo 5.44 ppm, más del doble del valor recomendado. Las provincias de Entre Ríos y Córdoba registran valores mucho menores que las otras provincias, cabe destacar que el número de muestras de esas provincias es mucho menor. Y hay algunas muestras que superan a los límites recomendado por la OMS. De las provincias analizadas hay ciudades que presentan diferente relación F/As, estos valores podría afectar a la salud de forma diferencial dado que no se observa la misma relación de una ciudad a otra. Quedará para proyectos posteriores la evaluación de esas relaciones diferenciales de F/As y cómo afectan a la salud.

TRABAJOS RELACIONADOS CON ESTE PROYECTO, PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

Chulibert, ME; Lupo, M; Fina, BL; Olguin, MC; Garcia, F; Posadas, M; Rigalli, A; Lombarte, M. Free sugar content in Argentinian beverages. Revista Argentina de Nutrición Humana y Dietética. In press.

Lombarte M; Fina, B l; Lima, AL; **Lupo M**; Buzalaf, MAR. Differential expression of protein in muscle of rats treated with fluoride and exercise. Fluoride, 2021.

Chulibert ME, **Lupo M**, Fina BL, Olguin MC, García F, Posadas M, Rigalli A, Lombarte M. Estimación de la ingesta de calcio y fosfato a partir de bebidas analcohólicas. Actual. Osteol 2021; 17(2).

Lupo M, Silvina Patricia Vaquero, María Belén Vescovo, Camila Sabina Izaguirre, Melina Vanesa Neira & Alfredo Rigalli. Optimisation and safety improvements of the spectrophotometric arsenic measurement. Int J Environ Anal Chem, 2020 DOI:https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1802440.

Lupo M, Neira MV, Chulibert ME, Vaquero S, Lombarte M. Use of fluoride for the measurement of bone remodelling in rats and human beings. Fluoride 53 (3 Pt 1): 477-482. 2020.

REFERENCIAS

Argentinasalud (2022) https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19 Capitulo XII, Bebidas hídricas, Agua y Agua gasificada, Agua potable, Artículo 982 , del Código Alimentario Argentino (Res Conj. SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007).

Guías para la calidad del agua de consumo humano (2011) CUARTA EDICIÓN QUE INCORPORA LA PRIMERA ADENDA. WHO, Ginebra.

Lupo M , Vaquero SP , Vescovo MB , Izaguirre CS , Neira MV & Rigalli A (2020) Optimisation and safety improvements of the spectrophotometric arsenic measurement, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, DOI: 10.1080/03067319.2020.1802440.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/. Rigalli A, et. al. (2007) Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. 1° Ed. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

ABSTRACT

Both fluoride (F) and arsenic (As) are toxic components naturally found as part of salts and rocks. The World Health Organization (WHO) places both within the 10 hazardous chemical substances for health and establishes a limit of 1.5 ppm of F and 10 ppb of As in drinking water. In our country they are natural components in the drinking water, so the objective of this project was to evaluate the presence of F and As in drinking water of Argentine Republic and establish the water sources consumed by the population (well, red, reverse osmosis or bottled). 450 samples from different areas of the country were measured and the concentration of As and F was evaluated and classified according to their source. Software was developed on the R platform to analyze the values. The results obtained are expressed as median (range): As (ppb): 11.85 (0-220.74) and F (ppm): 0.55 (0.03-5.45). More than 50% of the analyzed samples, regarding As do not comply with the WHO recommendation, while the percentage of F is 35%. Significant differences were found between red, well and reverse osmosis and bottled water. Indicating that the greater the purification of the water, the lower the concentration of As and/or F in the sample. 67% of the surveyed population consumes bottle water. La Pampa has a higher median with concentrations of As and F than those recommended by the WHO. In Santa Fe we found highest values of As though the median of F is within the recommended values. Entre Rios and Cordoba register much lower values than the other provinces. There are, also, cities that present a different F/As ratio, these values could affect health

differentially. The evaluation of these differential relationships of F/As and how they affect health will be left for later projects.

OBESIDAD INFANTIL Y RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA CALIDAD LIPOPROTEICA ASOCIADAS A INFLAMACIÓN Y RESISTENCIA INSULÍNICA

Maximiliano Martín, Walter Tetzlaff, Eliana Botta, Laura Boero, L. Gaete, Liliana Trifone, Fernando Brites

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

INTRODUCCIÓN

El estilo de vida sedentario en asociación con el consumo de dietas hipercalóricas ha contribuido significativamente al aumento de la prevalencia de la obesidad infantil en el mundo occidental. Este hecho resulta alarmante en función de las evidencias que muestran que los niños con exceso de peso en edad preescolar tienen mayor probabilidad de convertirse en adolescentes con sobrepeso y, posteriormente, en adultos obesos(1). Más aún, la ganancia rápida de peso en etapas tempranas de la niñez se relaciona con mayor morbimortalidad por diabetes tipo 2, apnea del sueño, hipertensión arterial, dislipemia, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular en la etapa adulta. No obstante, a pesar de que en la actualidad el sobrepeso y la obesidad en niños y adolescentes constituye uno de los problemas más acuciantes de la salud pública, aún no se han descripto completamente los procesos biológicos precisos que conectan a la obesidad del niño con la del adulto(2).

En condiciones fisiológicas, los adipocitos secretan diversas adipocitoquinas, entre las que se encuentran la leptina y la adiponectina. No obstante, esta secreción puede verse alterada en respuesta a factores injuriantes, como el aumento de los depósitos grasos. Consecuentemente, surge un fenotipo proinflamatorio, el cual desencadena un incremento de los niveles de proteína C reactiva ultrasensible(PCRus) secretada por el hígado y empleada como marcador de inflamaciónsistémica. Los niveles de esta proteína se asociaron positivamente con el índice de masa corporal (IMC) y la masa grasa tanto en adultos como en niños obesos. De hecho, existen trabajos que reportan la existencia de un estado proinflamatorio en niños con sobrepeso y obesidad (3,4). No obstante, la asociación entre el estado inflamatorio y la obesidad abdominal se encuentra insuficientemente estudiada. Más aún, los marcadores de inflamación sistémica se han mostrado insuficientes en la predicción del riesgo cardiometabólico(5), lo cual ha hecho necesaria la evaluación de otros biomarcadoresespecíficos de inflamación vascular. Tal es el caso de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2). Esta es una enzima sintetizada por células del sistema inmune y secretada a circulación, donde es transportada mayoritariamente por la lipoproteína de baja densidad (LDL)(6). La función de esta enzima consiste en hidrolizar fosfolípidos oxidados, liberando al medio ácidos grasos oxidados y lisofosfatidilcolina, productos con una amplia variedad de efectos

proaterogénicos (6). De hecho, diversos estudios han descripto una asociación directa entre la concentración y la actividad de esta enzima con el mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (7).

Por otro lado, el adipocito visceral presenta naturalmente una menor sensibilidad a la insulina. En consecuencia, el aumento de la masa adiposa visceral favorece el desarrollo de un hiperinsulinismo compensatorio. En un contexto de resistencia a la insulina, se suele observar un incremento de la concentración plasmática de triglicéridos, disminución de los niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), aumento de la proporción de las LDL pequeñas y densas, altamente aterogénicas, un enriquecimiento en triglicéridos de las LDL y alteración en la composición química y funcionalidad de las HDL, principalmente su capacidad para promover el eflujo de colesterol celular y su actividad antioxidante (8,9). Es importante tener en cuenta que las HDL son partículas sumamente heterogéneas cuya composición lipídica depende de la acción combinada de la enzima lecitina:colesterolaciltransferasa (LCAT), la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP), la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), y las lipasas endotelial y hepática (10). Más aún, la actividad biológica de estas partículas depende no solo de la composición lipídica de las mismas, sino también de la presencia de un proteomaespecífico(11, 12). De esta manera, incrementos en la capacidad ateroprotectora de estas partículas se corresponden con un mayor contenido de las mismas en apolipoproteína (apo) A-I, principal apolipoproteína de las HDL,yde la enzima antioxidante paraoxonasa 1 (PON 1) (11).

La CETP es una proteína que media el intercambio de colesterol esterificado de las HDL por triglicéridos de las lipoproteínas con apoB (13). El incremento de la actividad de CETP sería uno de los determinantes de la pérdida de las funciones antiaterogénicas de las HDL en condiciones como obesidad abdominal, síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Más aún, la presencia de estas HDL atípicas explicaría en parte el mayor riesgo cardiovascular de estos pacientes. Estudios previos reportaron no solo que la actividad de CETP se hallaba aumentada en niños obesos en comparación con no obesos, sino que sus niveles disminuían paralelamente a la pérdida de peso (14).

Por otra parte, PON 1 es una enzima antioxidante asociada a las partículas de HDL, la cual está involucrada en la prevención de la peroxidación lipídica. Más aun, PON 1 ejerce un rol importante en la protección de las células endoteliales del daño causado por los fosfolípidos oxidados (15). Existe evidencia que muestra una disminución en la actividad de esta enzima como resultado de obesidad abdominal en niños y adolescentes obesos (16).

Es de notar que el impacto de la obesidad abdominal sobre estos marcadores nóveles no se haya completamente descripto en niños y adolescentes.
El objetivo del presente estudio fue analizar el estatus de marcadores inflamatorios, del metabolismo de hidratos de carbono, del perfil lipídico y de enzimas y proteínas asociadas en niños y adolescentes obesos comparados con controles normopeso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental y Población de Estudio.

Estudio observacional transversal. Se incluyeron 20 niños y adolescentes entre 6 y 14 años de edad de ambos sexos con obesidad abdominal y 20 controles normopeso. Los niños y adolescentes fueron clasificados como obesosde acuerdo al Z-score de IMC y alpercentilo 90 de circunferencia de cintura. Todos los niños y adolescentes incluidos en el estudio provenían del Servicio de Nutrición y Diabetes del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez".

Características Antropométricas.

En los niños, se evaluópeso, talla y perímetro de cintura. Se calcularon los siguientes indicadores antropométricos: IMC, percentilos de IMC, score Z de IMC, percentilo 90 de circunferencia de cintura, y masa grasa.

Determinaciones Bioquímicas.

Niveles de glucosa e insulina, e índices de resistencia/sensibilidadinsulínica: Los niveles plasmáticos de glucosa se determinaron por un método estandarizado (Roche, Basilea, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501. Se midió la concentración plasmática de insulina con un enzimoinmunoensayo (MEIA, ABBOTT, Japón). Se calcularon los índices HOMA-IR (*Homeostasis ModelAssessment*), mediante la fórmula [Glucosa (mmol/l).Insulina (uU/ml)]/22,5 y QUICKI (*QuantitativeSensitivityCheckIndex*) mediante la fórmula 1/[ln Glucosa (mmol/l)+ln Insulina (mU/l)], indicadores de resistencia y sensibilidad insulínica, respectivamente.

Perfil de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas: Los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total se determinaron por métodos estandarizados (Roche, Basilea, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501. Se aislaron las HDL en el sobrenadante obtenido luego de la precipitación selectiva de las lipoproteínas con apo B utilizando reactivo precipitante 0,44 mmol/l ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio (17). Se evaluó el nivel de C-LDL como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol contenido en el sobrenadante obtenido después de la precipitación selectiva de LDL con 10 g/l polivinil sulfato en polietilenglicol (600 Da; 2,5 % P/V; pH=6,7) (18). Se calculóel colesterol-no-HDL como la diferencia entre el colesterol total y el C-HDL. Se obtuvo el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (C-VLDL) por diferencia entre el colesterol de los sobrenadantes de las determinaciones de C-LDL y de C-HDL. Se realizóel dosaje de apo B y apo A-I por inmunoturbidimetría (Roche, Basilea, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501.

Concentración plasmática de marcadores de inflamación sistémica: Se determinóla concentración de PCR por un ensayo inmunoturbidimétrico ultrasensible (Roche, Basilea, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501.

Actividad de Lp-PLA2:Se midió la actividad de la Lp-PLA2empleando el ensayo radiométrico descrito por Blank y col. (19) con algunas modificaciones. Se llevó a cabo la extracción del acetato marcado liberado luego de la acción de la enzima sobre el sustrato lipídico mediante partición líquido-líquido y su cuantificación se realizó midiendo la radioactividad de la fase acuosa.

Promoción del eflujo de colesterol celular: La capacidad de las HDL para promover el eflujo de colesterol celular se determinó incubando las lipoproteínas aisladas con

macrófagos diferenciados a partir de células THP-1. Brevemente, las células se cargaron con [^{3}H]-colesterol mediante la incubación por 24 horas con 50 ug/ml de LDL acetiladas marcadas con [^{3}H]colesterol (1uCi/ml) en medio RPMI 1640 sin suero, suplementado con 50mM de glucosa, 2 mM de glutamina, 0,2 % de albúmina bovina y 100 ng/ml de penicilina/streptomicina. Luego, se incubaron 15 ug/ml de fosfolípidos de las HDL durante un período de 4 horas a 37ºC. Finalizada la incubación, se separaron las células de las HDL, presentes en el medio de cultivo, y se determinó la radioactividad por centelleo líquido.

Actividad de la CETP: Se determinóla actividad de la CETP en muestras de suero siguiendo el método radiométrico previamente descrito con pequeñas modificaciones (20). Para ello, se evaluó la capacidad del suero para promover la transferencia de colesterol esterificado tritiado desde la fracción de HDL_3 marcada biosintéticamente(^{3}H-CE-HDL_3) (NEN LifeScienceProducts, Boston, EEUU) hacia las lipoproteínas con apo B presentes en el suero. Se incubaron las muestras séricas con ^{3}H-CE-HDL_3 (50 umol/l de colesterol) e iodoacetato (1,5 mmol/l) en buffer TBS (pH=7,4) durante 3 horas a 37º C. Luego de la incubación, se separaron las lipoproteínas con apo B de las HDL mediante el método de precipitación selectiva utilizando ácido fosfotúngstico (0,44 mmol/l) en presencia de iones magnesio (21). Se midió la radioactividad en la mezcla de reacción y en el sobrenadante que contiene la fracción de HDL en un contador de centelleo líquido (Packard 210 TR; Packard Instruments, Meridians, CT).

Actividad de la enzima antioxidante PON1: Se evaluó la enzima PON1 en muestras de suero empleando dos sustratos diferentes: paraoxón (actividad paraoxonasa propiamente dicha, PON) y fenilacetato (actividad arilesterasa, ARE). Ambas actividades se midieron siguiendo el método espectrofotométrico previamente descripto (22). Brevemente, se determinó la actividad PON añadiendo 20 µl de suero a 2 ml de buffer TRIS / HCl (100 mmol/l, pH=8,0) conteniendo 2 mmol/l $CaCl_2$, 1 mol/l NaCl y 2,6 mmol/l paraoxón (O,O-dietil-O-p-nitrofenil-fosfato). Se monitoreó la tasa de generación de p-nitrofenol a una longitud de onda de 405 nm y a una temperatura de incubación de 25º C, en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se registró el aumento de la absorbancia en intervalos de 30 segundos durante un lapso de 5 minutos, luego de 30 segundos de un período de preincubación. Se calculó la actividad enzimática a partir del coeficiente de extinción molar (17.000 mol^{-1} cm^{-1}). Por otra parte, la actividad ARE se evaluó añadiendo 20 µl de suero diluido 1/20 a 2 ml de buffer TRIS / acetato (50 mmol/l, pH=7,8) conteniendo 20 mmol/l $CaCl_2$ y 4,4 mmol/l fenilacetato. Se monitoreó la tasa de generación de fenol a una longitud de onda de 270 nm y a una temperatura de incubación de 25º C, en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se registró el aumento de absorbancia en intervalos de 30 segundos durante un lapso de 5 minutos, luego de 30 segundos de un período de preincubación. Se calculó la actividad enzimática a partir del coeficiente de extinción molar (1.310 mol^{-1} cm^{-1}).

RESULTADOS

En la tabla 1, se muestran los resultados de los parámetros bioquímicos generales del metabolismo de hidratos de carbono y del perfil lipídico. Los niños y adolescentes obesos exhibieron mayores niveles de insulina basal, HOMA-IR, triglicéridos, C-LDL, C-no-HDL, y C-VLDL, junto con menores valores de QUICKI, C-HDL y apo A-I. Más aún, el grupo de niños obesos mostró mayor actividad de Lp-PLA2 y menores valores de eflujo

de colesterol celular y de actividad ARE, en comparación con el grupo control (Figuras 1 a 4).

Tabla 1. Características Bioquímicas Generales

Parámetro	Controles (n=20)	Obesos (n=20)
Edad (años)	11,8 ±2,7	13,1 ±1,9
Sexo (f/m)	8/12	11/9
Glucosa (mg/dl)	87 (82-88)	87 (82-92)
Insulina (uU/ml)	9 (6-13)	13 (9-22)*
HOMA-IR	1,5 (1,1-1,9)	2,6 (2,0-4,5)*
QUICKI	0,35 (0,33-0,37)	0,33 (0,30-0,34)*
TG (mg/dl)	69 (45-95)	96 (76-121)*
CT (mg/dl)	156 ±37	165 ±24
C-LDL (mg/dl)	85 ±32	106 ±25*
C-HDL (mg/dl)	57 ±10	39 ±9*
C-no-HDL (mg/dl)	99 ±34	128 ±26*
C-VLDL (mg/dl)	16 (10-17)	19 (15-27) *
Apo B (mg/dl)	75 ±18	87 ±19
Apo A-I (mg/dl)	143 ±25	125 ±19*
CT/C-HDL	2,8 ±0,6	4,7 ±1,5*
TG/C-HDL	1,1 (1,0-1,8)	2,2 (1,4-3,2)*
Apo A-I/apo B	2,0 ±0,4	1,5 ±0,4*
PCRus (mg/l)	0,6 (0,6-2,7)	1,7 (1,3-2,9)

TG, triglicéridos; CT, colesterol total, LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; Apo, apolipoproteína; PCRus, proteína c reactiva ultrasensible. *p<0,05*vs*. controles.

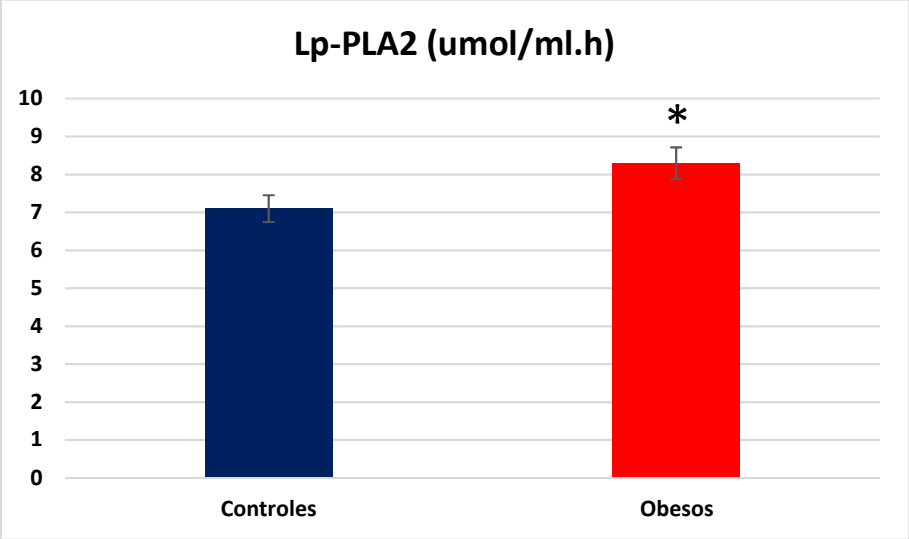


Figura 1. Actividad de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) en niños y adolescentes obesos comparados con controles normopeso. *p<0,05*vs*. controles.

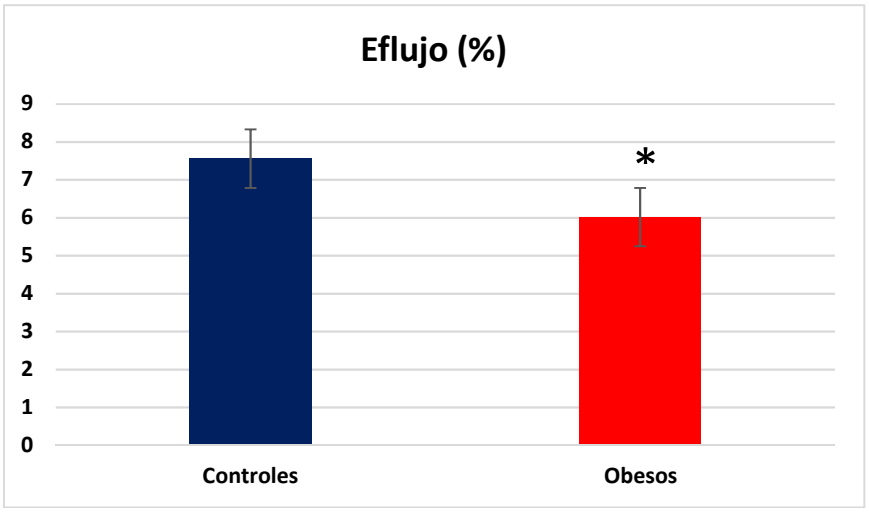


Figura 2. Eflujo de colesterol celular en niños y adolescentes obesos comparados con controles normopeso. *p<0,05*vs*. controles.

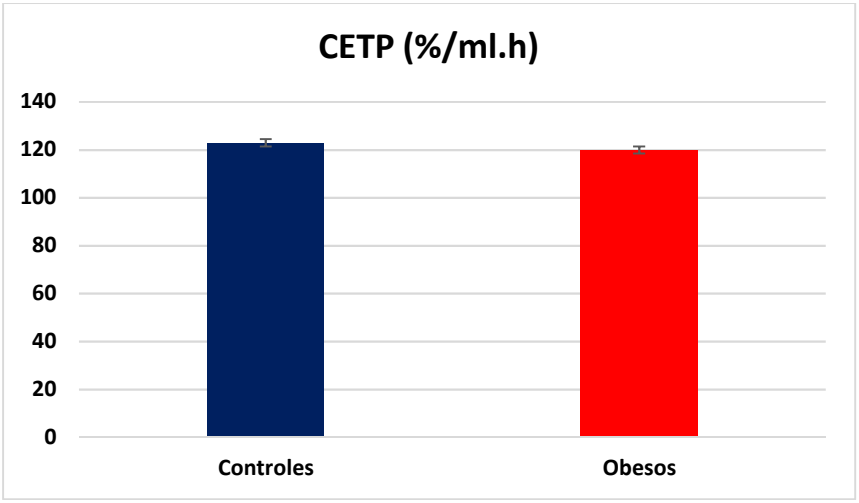
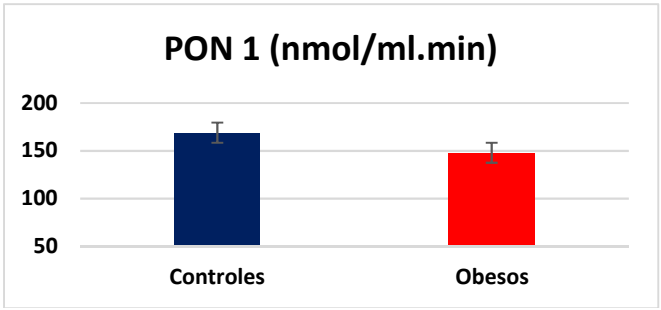


Figura 3. Actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) en niños y adolescentes obesos comparados con controles sanos.



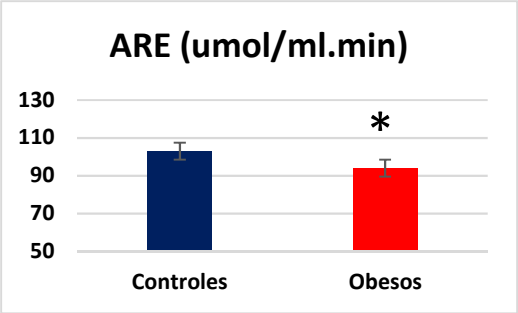


Figura 4. Actividades paraoxonasa (PON) y arilesterasa (ARE) en niños y adolescentes obesos comparados con controles normopeso. *p<0,05 *vs*. controles.

La actividad de Lp-PLA2 correlacionócon colesterol total (r=0,71; p<0,01), C-LDL (r=0,72; p<0,01), C-VLDL (r=0,38; p<0,05), C-no-HDL (r=0,76; p<0,01), y apo B (r=0,6; p<0,01).El eflujo de colesterol celular se asoció significativamente con TG (r=-0,28; p<0,05) y z-BMI (r=-0,36; p<0,05). La actividad ARE correlacionó con C-HDL (r=0,32; p<0,05), apo A-I (r=0,43; p<0,01) y PON (r=0,31; p<0,05). La actividad de PON se asoció a apo B (r=-0,28; p<0,05) y apo A-I/apo B (r=0,31; p<0,05). No se observaron asociaciones significativas con la actividad de CETP.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los niños y adolescentes obesos mostraron alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, caracterizado por mayores valores de insulina e índice HOMA-IR, y menores del cociente QUICKI. Además, estos niños y adolescentes exhibieron un perfil lipídico más aterogénico consecuencia de mayores niveles de triglicéridos, C-LDL, C-no-HDL, C-VLDL, CT/C-HDL y TG/C-HDL, además de menor concentración de C-HDL, apo A-I y cociente apo A-I/apo B. Más aún, el grupo obeso presentó mayor actividad Lp-PLA2 y sus HDL mostraron menor capacidad para promover el eflujo de colesterol y actividad ARE. Estos hallazgos indicarían la presencia de un estado inflamatorio específico vascular y de partículas de HDL disminuidas en su capacidad ateroprotectora.

La obesidad infantil se ha transformado en uno de los problemas de salud pública más importantes de la actualidad (2). Esto es de gran relevancia debido a que la presencia de obesidad durante la niñez se asocia al desarrollo temprano de comorbilidades asociadas tales como la resistencia insulínica, la dislipemia y la enfermedad cardiovascular (1). Es bastante conocido el vínculo entre la obesidad y el desarrollo de resistencia insulínica durante la niñez (23, 24). En concordancia, los niños y adolescentes incluidos en nuestro estudio mostraron mayores niveles de insulina y HOMA-IR, junto con menores valores de QUICKI. Más aún, los niveles de HOMA-IR se asociaron negativamente con los niveles de C-HDL (r=-0,55; p<0,01) y apo A-I(r=-0,28; p<0,01), vinculando a la resistencia insulínica con el deterioro de las partículas de HDL.

En un contexto de obesidad y resistencia insulínica, se desencadenan alteraciones en el tejido adiposo que son componente fundamental para el desarrollo de la denominada dislipemia aterogénica, caracterizada por un aumento en los niveles plasmáticos de triglicétidos con la consecuente disminución en la concentración de C-HDL (8). La presencia de esta dislipemia característica de la obesidad se encuentra bien documentada en niños obesos (25). Como era esperado, en el presente estudio, los niños y adolescentes obesos mostraron mayores niveles de triglicéridos y una menor concentración de C-HDL.

Más aún, estos niños y adolescentes mostraron mayores niveles de C-LDL, C-no-HDL, C-VLDL y de los índices CT/C-HDL, utilizado como marcador de riesgode enfermedad cardiovascular (26), y TG/C-HDL, considerado marcador de resistencia insulínica (27), junto a menores niveles de apo A-I y del cociente apo A-I/apo B, marcador de riesgo aterogénico (26). Estas alteraciones reflejarían el deterioro cuantitativo y cualitativo de las lipoproteínas, particularmente de las HDL.

La presencia de obesidad se asocia con la alteración de numerosas vías inflamatorias y el establecimiento de un proceso de inflamación crónica (28). Resulta interesante que el análisis de un marcador de inflamación sistémico, como la concentración plasmática de PCRus, no reveló diferencias entre el grupo de niños obesos y los controles sanos en el presente estudio. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la actividad de Lp-PLA2, considerado marcador de inflamación especifica vascular (6) y factor de riesgo novel para enfermedad cardiovascular (7). En un estudio previo, se observó un aumento de la actividad de esta enzima en adolescentes obesos (29), mientras que otro reportó un aumento de la concentración de la misma en niños obesos (30). El presente trabajo sería el primero en reportar un aumento de la actividad de la misma en una población de estudio que incluía niños y adolescentes obesos.

Las HDL constituyen la única lipoproteína con funciones ateroprotectoras; estas propiedades comprenden entre otras a su capacidad para promover el transporte inverso del colesterol (8). El primer paso del transporte inversoestá representado por el eflujo de colesterol desde las células de tejidos periféricos hacia las partículas de HDL. En el presente estudio, las HDL de niños y adolescentes obesos mostraron una disminución en esta función cuando fueron incubadas con macrófagos humanos de la línea THP-1. En este sentido, un estudio previo reportó que la capacidad para promover el eflujo de colesterol de las HDL se asociaba negativamente a la adiposidad en niños (31). Más aún, esta función de las HDL se encontraría disminuida en adolescentes con sobrepeso (32) y esta disminución podría ser revertida con la pérdida de peso (33, 34). De acuerdo con nuestro conocimiento, el presente estudio sería el primero en evaluar la promoción de eflujo de colesterol por parte de las HDL de niños menores a 12 años.

Las propiedades funcionales de las HDL dependen en gran parte de los diversos componentes asociados a las mismas. Ejemplo de esos componentes son la apo A-I, principal apolipoproteína de las HDL, la CETP y la PON 1. CETP es una proteína de transporteresponsable por el intercambio de triglicéridos y ésteres de colesterol entre las HDL y las lipoproteínas con apo B (13). Incrementos en la actividad de esta proteína desencadenarían una disminución en la funcionalidad de las HDL (13). Estudios previos han mostrado incrementos de la actividad de esta proteína en niños obesos (14, 35). En el presente estudio, el grupo de niños y adolescentes obesos no mostró diferencias en la actividad de esta proteína. La diferencia con lo reportado en la bibliografía podría deberse a que los estudios previos no incluyeron adolescentes; de hecho, el presente estudio sería el primero en explorar el rol de la CETP en el metabolismo lipídico en niños mayores a 10 años. Por su lado, PON 1 es una enzima antioxidante asociada a las partículas de HDL. Su actividad contribuye de manera fundamental a la capacidad de las partículas de HDL para prevenir la oxidación de las partículas de LDL (15). En el presente estudio, se evaluó su actividad mediante dos sustratos: paraoxon (actividad PON) y fenilacetato (actividad ARE). Los niños y adolescentes obesos mostraron una disminución significativa en la actividad ARE comparados con los controles normopeso. Esto está en concordancia con estudios previos los cuales han mostrado una disminución en la actividad de esta enzima en niños obesos (16, 36). Por otro lado, estas alteraciones se asociarían directamente a alteraciones en el tejido adiposo (36).

Los niños y adolescentes obesos mostraron un estado de resistencia insulínica y un perfil lipídico más aterogénico. Estas alteraciones estarían asociada a la presencia de inflamación específica vascular y deterioro en la capacidad ateroprotecrora de las HDL. Como resultado, estos niños y adolescentes presentarían alteraciones cualitativas en sus lipoproteínas, las cuales podrían determinar un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular temprana en la edad adulta.

RESUMEN

El estilo de vida sedentario en asociación con el consumo de dietas hipercalóricas ha contribuido significativamente al aumento de la prevalencia de la obesidad infantil en el mundo occidental. Este hecho resulta alarmante en función de las evidencias que muestran que los niños con exceso de peso en edad preescolar tienen mayor probabilidad de convertirse en adolescentes con sobrepeso y, posteriormente, en adultos obesos. Es bien conocida la asociación entre la presencia de obesidad en la infancia y el desarrollo de complicaciones asociadas, como la diabetes, la dislipemia y la aterosclerosis temprana. En este contexto, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) constituyen la única fracción lipoproteica con funciones ateroprotectoras. Estas funciones incluyen principalmente la promoción del transporte inverso del colesterol y la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), actualmente consideradas los verdaderos marcadores de la capacidad cardioprotectora de las HDL. La información referente al estatus de estas funciones en niños y adolescentes obesos es escasa. El objetivo del presente estudio fue analizar el estatus de marcadores inflamatorios, del metabolismo de hidratos de carbono, del perfil lipídico, de enzimas y proteínas asociadas a lipoproteínas y de la funcionalidad de las HDL en niños y adolescentes obesos comparados con controles sanos. Los niños y adolescentes se clasificaron como obesos de acuerdo con su z score de índice de masa corporal (z-IMC), siguiendo las recomendaciones de la OMS. Se incluyeron 15 niños y adolescentes obesos (9-15 años de edad) y 15 controles pareados por sexo y edad. Se cuantificaron los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol-HDL (C-HDL), colesterol-LDL (C-LDL), apolipoproteínas (apo) A-I y B, glucosa, e insulina por métodos automatizados. Se calcularon el colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (C-VLDL), el C-no HDL (CT – C-HDL) y los índices TG/C-HDL (indicador de resistencia insulínica y de la proporción de LDL pequeñas y densas), CT/C-HDL, apo A-I/apo B (indicadores de riesgo aterogénico), y HOMA-RI (indicador de resistencia insulínica). Para determinar la capacidad para promover el eflujo de colesterol celular, se empleó la línea de monocitos THP-1. Las actividades d la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) y de la proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP) se evaluaron por métodos radiométricos y la correspondiente a la enzima antioxidante paraoxonasa (PON) 1 se midió por un ensayo colorimétrico empleando dos sustratos: paraoxon (actividad PON) y fenilacetato (actividad ARE). Los niños y adolescentes obesos mostraron mayores valores de TG [96 (76-121) *vs*. 69 (45-95) mg/dl; p<0,05], C-VLDL (19 (15-27) *vs*. 16 (10-17) mg/dl; p<0,05), C-no HDL (128 ± 26 *vs*. 99 ± 34 mg/dl; p<0,05), CT/C-HDL (4,7 ± 1,5 *vs*. 2,8 ± 0,6; p<0,01), TG/C-HDL [2,2 (1,4-3,2) *vs*. 1,1 (1,0-1,8); p<0,01], HOMA-RI (2,6 (2,0-4,5) *vs*. 1,5 (1,1-1,9); p<0,01), y actividad de Lp-PLA2 (8,3 ± 1,9 vs 7,1 ± 1,7 umol/ml.h; p<0,05) además de menores niveles de C-HDL (39 ± 9 *vs*. 57 ± 10 mg/dl; p<0,01), de apo A-I (125 ± 19 *vs*. 143 ± 25 mg/dl), y cociente apo A-I/apo B (1,5 ± 0,4 *vs*. 2,0 ± 0,4; p<0,01). El eflujo de colesterol [7,0 (5,5-8,9) *vs*. 9,0 (7,4-9,8) %; p<0,01] y la actividad ARE (96 ± 19 *vs*. 110 ± 19 umol/ml*min; p<0,05) también resultaron significativamente menores en los

pacientes respecto a los controles. La actividad de Lp-PLA2 correlacionó con CT (r=0,71; p<0,01), C-LDL (r=0,72; p<0,01), C-VLDL (r=0,38; p<0,05), C-no-HDL (r=0,76; p<0,01), y apo B (r=0,6; p<0,01). El eflujo de colesterol celular se asoció significativamente con TG (r=-0,28; p<0,05) y z-BMI (r=-0,36; p<0,05). La actividad ARE correlacionó con C-HDL (r=0,32; p<0,05), apo A-I (r=0,43; p<0,01) y PON (r=0,31; p<0,05). La actividad de PON se asoció a apo B (r=-0,28; p<0,05) y apo A-I/apo B (r=0,31; p<0,05). Los niños y adolescentes obesos mostraron un estado de resistencia insulínica y un perfil lipídico más aterogénico. Estas alteraciones estarían asociadas a la presencia de inflamación específica vascular y deterioro en la capacidad ateroprotecrora de las HDL. Como resultado, estos niños y adolescentes presentarían alteraciones cualitativas en sus lipoproteínas las cuales podrían determinar un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular temprana en la edad adulta.

ABSTRACT

Sedentary lifestyle in association with hypercaloric diets has significantly contributed to the increase in childhood obesity prevalence in the western world. This fact is noteworthy given that evidence show that preschool children with excess weight have greater probability of becoming overweight teenagers and subsequently, obese adults. The association between the presence of childhood obesity and the development of complications such as diabetes, dyslipidemia and premature atherosclerosis is well known. In this context, high density lipoproteins (HDL) constitute the only lipoprotein fraction with ateroprotective properties. These functions include among others, the promotion of reverse cholesterol transport and the inhibition of low-density lipoprotein (LDL) oxidation, currently considered the true markers of HDL antiatherogenic capacity. To our knowledge, information regarding these functions in obese children and adolescents is scarce. The aim of the present study was to analyze inflammatory markers status, carbohydrate metabolism, lipid profile and HDL functionality in obese children and adolescents compared to healthy controls. Children and adolescents were classified as obese according to their body mass index z-score following World Health Organization recommendations. Twenty obese children and adolescents (9-15 years old) and 20 age-sex matched healthy controls were included in the study. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), HDL-C, LDL-C, apolipoproteins (apo) A-I and B, glucose and insulin levels were quantified by automatized methods. Very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and non HDL-C levels, plus TG/HDL-C CT/HDL-C, apo A-I/apo B and HOMA-IR index were calculated.Efflux cholesterol was determined employing the human monocyte line THP-1.Lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and cholesteryl ester transfer protein (CETP) activities were evaluated by radiometric methods and that of antioxidant enzyme paraoxonase 1 (PON 1) by a colorimetric assay employing two substrates paraoxon (PON activity) and phenyl-acetate (ARE activity). Obese children and adolescents showed higher TG [96 (76-121) *vs*. 69 (45-95) mg/dl; p<0.05], VLDL-C (19 (15-27) *vs*. 16 (10-17) mg/dl; p<0.05), no HDL-C (128 ± 26 *vs*. 99 ± 34 mg/dl; p<0.05), CT/HDL-C (4.7 ± 1.5 *vs*. 2.8 ± 0.6; p<0.01), TG/HDL-C [2.2 (1.4-3.2) *vs*. 1.1 (1.0-1.8); p<0.01], and HOMA-IR (2.6 (2.0-4.5) *vs*. 1.5 (1.1-1.9); p<0.01) values, plus Lp-PLA2 activity (8.3 ± 1.9 *vs*. 7.1 ± 1.7 umol/ml.h; p<0.05) in addition to lower HDL-C levels (39 ± 9 *vs*. 57 ± 10 mg/dl; p<0.01), de apo A-I (125 ± 19 *vs*. 143 ± 25 mg/dl), and apo A-I/apo B ratio (1.5 ± 0.4 *vs*. 2.0 ± 0.4; p<0.01). Cholesterol efflux [7.0 (5.5-8.9) *vs*. 9.0 (7.4-9.8) %; p<0.01] and ARE activity (96 ± 19 *vs*. 110 ± 19 umol/ml*min; p<0.05) were also significantly lower in the obese group compared to

controls. Lp-PLA2 activity correlatedwithCT (r=0.71; p<0.01), LDL-C (r=0.72; p<0.01), VLDL-C (r=0.38; p<0.05), non HDL-C (r=0.76; p<0.01), and apo B (r=0.60; p<0.01). Cholesterol efflux was associated with TG (r=-0.28; p<0.05) and BMI-z (r=-0.36; p<0.05). ARE activity correlated HDL-C (r=0.32; p<0.05), apo A-I (r=0.43; p<0.01) and PON (r=0.31; p<0.05). PON activity associated with apo B (r=-0.28; p<0.05) and apo A-I/apo B (r=0.31; p<0.05). Obese children and adolescents showed insulin resistance and a more atherogenic lipid profile. These alterations would be associated to the presence of vascular specific inflammation and impairment of HDL atheroprotective capacity. As a result, these children and adolescents would present qualitative alterations in their lipoproteins which would determine higher risk of suffering early cardiovascular disease during adulthood.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. I'Allemand, D *y col.*Cardiovascular risk in 26,008 European overweight children as established by a multicenter database. Obesity (Silver Spring) 2008; **16**: 1672-9.
2. Galic, S *y col.* Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol 2010; **316**: 129-39.
3. Roth, CL *y col.* Changes in adipose-derived inflammatory cytokines and chemokines after successful lifestyle intervention in obese children. Metabolism 2010.
4. Dedoussis, GV *y col.* Expression of inflammatory molecules and associations with BMI in children. Eur J Clin Invest 2010; 40: 388-92.
5. Ebenbichler, CF *y col.* Relationship between cholesteryl ester transfer protein and atherogenic lipoprotein profile in morbidly obese women. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 1465-9.
6. Wilensky, RL y Macphee, CH. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 2009.
7. Davidson, MH *y col.* Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. Am J Cardiol 2008.
8. de Souza, JA y col. Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. Atherosclerosis 2008.
9. Scheffer, PG y col. Effect of three consecutive meals on the physicochemical properties of HDL and LDL in individuals with the metabolic syndrome and patients with type 2 diabetes. Eur J Clin Nutr 2011.
10. Rye, KyBarter, P. Formationandmetabolismofprebeta-migrating,lipid-poorapolipoprotein A-I. ArteriosclerThrombVasc Biol.24: 421-28. 2004.
11. Davidson, W;Silva, R;Chantepie, S;Lagor, W;Chapman, M;Kontush, A.ProteomicanalysisofdefinedHDLsubpopulationsreveals article specificproteinclusters:relevancetoantioxidativafunction. ArteriosclerThrombVasc Biol.29: 870-76. 2009.
12. Kontush, A; Therond, P; Zerrad, A;Couturier, M;Négre-Salvayre, A;de Souza, J;Chantepie S; Chapman, M.Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and

sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27: 1843-9. 2007.

13. Barter, PJ y col. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003.
14. Asayama, K y col. Increased serum cholesteryl ester transfer protein in obese children. Obes Res 2002.
15. Aviram, M;Rosenblat, M; Bisgaier, C;Newton, R; Primo-Parmo, S; La Du, B. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possibleperoxidative role forparaoxonase. J Clin Invest.101: 1581-90. 1998.
16. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Hotowy K, Czapińska E, Majda J, Kustrzeba-Wójcicka I, Noczyńska A, Gamian A. Paraoxonase (PON)1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress.Adv Clin ExpMed. 22 :229-36. 2013.
17. Warnik, G; Mayfield, C; Benderson, J;Chen, J;Albers, J.HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate-Mg2+ and by dextran sulfate-Mn2+-polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method.Am. J. Clin. Pathol. 78: 718-23. 1982.
18. Assmann, G; Jabs, H; Nolte, W; Schriewer, H. Precipitation of LDL with sulphopolyanions: a comparison of two methods for LDL cholesterol determination. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 781-85. 1984.
19. Blank, M; Hall, M;Cress, E;Snyder F. Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113: 666-71. 1983.
20. Lagrost, L; Gandjini, H;Athias, A;Guyard-Dangremont, V;Lallemant, C;Gambert, P. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. Arterioscler. Thromb. 13: 815-25. 1993.
21. Warnik, G; Mayfield, C;Benderson, J;Chen, J;Albers, J.HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate-Mg2+ and by dextran sulfate-Mn2+-polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method.Am. J. Clin. Pathol. 78: 718-23. 1982.
22. Furlong, C; Richter, R;Seidel, S;Costa, L;Motulsky A. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. Anal Biochem. 80: 242-47. 1989.
23. Chiarelli FyMarcovecchioML.Insulin resistance and obesity in childhood.Eur J Endocrinol. 159:S67-74. 2008.
24. Marcovecchio ML, Mohn A, Chiarelli F.Obesity and insulin resistance in children.JPediatr Gastroenterol Nutr. 51:S149-50. 2010.
25. D'Adamo E, Guardamagna O, Chiarelli F, Bartuli A, Liccardo D, Ferrari F, Nobili V.Atherogenic dyslipidemia and cardiovascular risk factors in obese children.Int J Endocrinol. 2015:912047. 2015.
26. Behiry EG, El Nady NM, AbdElHaie OM, Mattar MK y Magdy A. Evaluation of TG-HDL Ratio Instead of HOMA Ratio as Insulin Resistance Marker in Overweight and

Children with Obesity.EndocrMetab Immune Disord Drug Targets. 19:676-682. 2019.

27. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, y Steiner E.High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study.Lancet. 358:2026-33. 2001.
28. Monteiro R y Azevedo I.Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome.MediatorsInflamm. 2010.
29. da Silva IT, Timm Ade S, DamascenoNR.Influence of obesity and cardiometabolic makers on lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in adolescents: the healthy young cross-sectional study.Lipids Health Dis. 12:19. 2013.
30. Sakka S, Siahanidou T, Voyatzis C, Pervanidou P, Kaminioti C, Lazopoulou N, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, PapassotiriouI.Elevated circulating levels of lipoprotein-associated phospholipase A2 in obese children.Clin Chem Lab Med. 53:1119-25. 2015.
31. Khalil H, Murrin C, O'Reilly M, Viljoen K, Segurado R, O'Brien J, Somerville R, McGillicuddy F, Kelleher CC.Total HDL cholesterol efflux capacity in healthy children - Associations with adiposity and dietary intakes of mother and child.NutrMetab Cardiovasc Dis. 27:70-77. 2017.
32. Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Cardoso-Saldaña G, Jorge-Galarza E, Posadas-Sánchez R, Martínez-Alvarado R, Caracas-Portilla N, Mendoza Pérez E, Posadas-Romero C.Abnormal high-density lipoproteins in overweight adolescents with atherogenic dyslipidemia.Pediatrics. 127:1521-7. 2011.
33. Davidson WS, Inge TH, Sexmith H, Heink A, Elder D, Hui DY, Melchior JT, Kelesidis T, Shah AS.Weight loss surgery in adolescents corrects high-density lipoprotein subspecies and their function.Int J Obes (Lond). 41:83-89. 2017.
34. Wesnigk J, Bruyndonckx L, Hoymans VY, De Guchtenaere A, Fischer T, Schuler G, Vrints CJ, Adams V.Impact of Lifestyle Intervention on HDL-Induced eNOS Activation and Cholesterol Efflux Capacity in Obese Adolescent.Cardiol Res Pract. 2016:2820432. 2016.
35. Hayashibe H, Asayama K, Nakane T, Uchida N, Kawada Y, Nakazawa S.Increased plasma cholesteryl ester transfer activity in obese children.Atherosclerosis. 129:53-8. 1997.
36. Koncsos P, Seres I, Harangi M, Illyés I, Józsa L, Gönczi F, Bajnok L, ParaghG.Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels.Pediatr Res. 67:309-13. 2010.

EVALUACIÓN PILOTO DEL ESTADO DE SALUD DE DOS GRUPOS DE ADOLESCENTES DE ÁREAS RURALES A TRAVÉS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y BIOMARCADORES GENÉTICOS COMO APORTE AL ESTABLECIMIENTO DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE LA EXPOSICIÓN A AGROQUÍMICOS EN MENORES DE EDAD DE LA REPÚBLICA ARGENTINA

Fabián Martínez Perafán[1], Marcela López Nigro[1], Marta Ana Carballo[1]

[1]Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
INFIBIOC (Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica).
CIGETOX – Citogenética Humana y Genética Toxicológica

RESUMEN

La exposición a agroquímicos es un tema controversial cuya investigación se ha enfocado principalmente en el efecto a la salud de agricultores adultos. A pesar de que niños y adolescentes residentes de zonas de cultivos pueden estar expuestos de manera indirecta a herbicidas y pesticidas, los estudios sobre esta población son escasos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado de salud de un grupo de adolescentes expuestos indirectamente a agroquímicos y un grupo no expuesto, mediante el análisis de parámetros bioquímicos y el ensayo citoma. Los resultados mostraron que los valores de los parámetros bioquímicos de los adolescentes de ambos grupos se encontraban dentro de los rangos de referencia para adolescentes sanos, aunque con algunas diferencias de acuerdo con el sexo de los individuos. Con relación al ensayo citoma en linfocitos, se evidenció una mayor frecuencia de micronúcleos (MN) y brotes nucleares (NBUD) en el grupo no expuesto (p = 0,040; p = 0,002 respectivamente). Sin embargo, los valores de estos marcadores de genotoxicidad para ambos grupos correspondían con los valores de referencia para individuos sanos reportados en la literatura. Por último, la frecuencia de MN en células de mucosa bucal (CMB) fue mayor en el grupo expuesto (p < 0,001), mientras que se observó un mayor número de NBUD en este tipo de células para el grupo no expuesto (p < 0,001). Asimismo, la frecuencia de células con cromatina condensada y cariolisis fue mayor en el grupo sin exposición (p < 0,001). Estos resultados podrían indicar un daño genotóxico diferente en cada grupo y una mayor tasa de recambio del epitelio bucal en el grupo no expuesto. Sin embargo, aún no es clara la significancia biológica de los marcadores del ensayo citoma en CMB, por lo que un aumento del tamaño muestral y nuevos estudios son necesarios para alcanzar resultados contundentes. En conclusión, este estudio brindó información sobre el estado de salud de dos grupos de adolescentes de zonas rurales y contribuyó a la creación de una base de datos epidemiológicos sobre menores de edad expuestos a agroquímicos en la República Argentina.

INTRODUCCIÓN

La exposición ambiental/ocupacional a agroquímicos es una problemática que ha generado varios debates en los últimos años. En muchos países, principalmente europeos, el uso de estos compuestos para el control de plagas y malezas es tema de controversia. Sin embargo, en países de Suramérica existe un uso extendido de los agroquímicos en la industria agrícola, siendo los herbicidas de amplio espectro a base de glifosato los más comunes (López et al., 2012).

Algunos estudios han evidenciado el efecto genotóxico de los agroquímicos y sus metabolitos en diferentes modelos experimentales (Alvarez-Moya et al., 2014; Mensah et al., 2015). Por otra parte, existen reportes que relacionan la exposición a pesticidas con enfermedades crónicas como cáncer y diabetes; desórdenes neurodegenerativos entre ellos Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, además con defectos de nacimiento y problemas reproductivos (IARC, 2017; Mostafalou & Abdollahi, 2013). Pese a la evidencia científica, en muchos países no existe una regulación clara sobre el uso de agroquímicos y muchas personas utilizan los productos fitosanitarios de forma inadecuada sin atender las mínimas medidas de protección personal.

Con relación a las formulaciones de los agroquímicos, la mayoría incluyen como principios activos compuestos organofosforados (OF), *N*-metilcarbamatos (MC), organoclorados (OC) y piretroides (PT) con diferentes adyuvantes e ingredientes presuntamente "inertes" o impurezas (Eastmond & Balakrishnan, 2010; Hernández et al., 2014).

Particularmente la exposición aguda a plaguicidas OF inhibe la acetilcolinesterasa, lo que produce la acumulación de acetilcolina y la sobreestimulación de sus receptores en las sinapsis del sistema nervioso autónomo, el sistema nervioso central y las uniones neuromusculares. Esto se evidencia en síntomas que van desde broncoespasmo, bradicardia, miosis, vómito, diarrea hasta confusión, agitación, coma y/o insuficiencia respiratoria (Eddleston et al., 2008). Por otra parte, la exposición crónica a OF induce efectos sobre el sistema nervioso central que pueden manifestarse como simples dolores de cabeza hasta trastornos del comportamiento y desórdenes neuropsiquiátricos que pueden no estar ligados a síntomas colinérgicos (Binukumar & Gill, 2011).

Los agroquímicos no solo actúan a nivel neurológico, sino que también pueden afectar a biomoléculas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), los lípidos y las proteínas a través del aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs) relacionadas con estrés oxidativo (Mostafalou & Abdollahi, 2013).

Es evidente que la exposición a agroquímicos es un tema de salud ocupacional relevante, sin embargo, la mayoría de los países agrícolas no cuenta con un sistema de vigilancia epidemiológica que monitoree la salud de las personas expuestas a los productos fitosanitarios. En este sentido los estudios de biomonitoreo humano son una herramienta esencial para la detección temprana de riesgos para la salud de las personas expuestas (World Health Organization, 2015).

Considerando únicamente la exposición por la aspersión localizada de herbicidas y pesticidas a través del uso de bombas de espalda o "mochilas", se puede decir que no solo están expuestos los trabajadores que directamente manipulan las mezclas químicas utilizadas en los cultivos, sino también las personas que conviven con ellos y residen cerca del área de aplicación de los productos fitosanitarios. Este tipo de exposición indirecta podría afectar especialmente a los niños y adolescentes que son más sensibles que los adultos a los efectos de la exposición ambiental a sustancias químicas (World Health Organization, 2011).

De acuerdo a lo anterior, es importante la realización de estudios de biomonitoreo en poblaciones de niños en diferentes etapas del desarrollo, que evalúen tanto la exposición agregada como acumulativa a sustancias químicas usando diversos biomarcadores (World Health Organization, 2006). El análisis de parámetros bioquímicos en sangre, por ejemplo, es una forma de evaluar el estado de salud general de un individuo. Por otra parte, los biomarcadores del ensayo citoma brindan información sobre el efecto genotóxico de la exposición ambiental u ocupacional a sustancias químicas (Fenech et al., 2016).

Teniendo en cuenta la falta de información sobre la salud de los menores de edad expuestos indirectamente a agroquímicos, este estudio piloto tiene como objetivo evaluar mediante parámetros bioquímicos y el ensayo citoma el estado de salud de dos grupos de adolescentes argentinos: un primer grupo que reside cerca de áreas de cultivos hortícolas, por lo tanto, expuesto indirectamente a agroquímicos; y un segundo grupo no expuesto a productos fitosanitarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio.

Este es un estudio piloto de tipo descriptivo transversal que evaluó el estado de salud de dos grupos de adolescentes: 30 menores del departamento de Montecarlo en la Provincia de Misiones y 24 del partido de Exaltación de la Cruz en la Provincia de Buenos Aires. En Misiones se observó el establecimiento de cultivos agrícolas cerca de las viviendas donde residían los participantes del estudio (generalmente una distancia menor a 100 metros).

El estudio siguió las normativas y principios establecidos en la Declaración de Helsinki para la investigación médica en seres humanos (World Medical Association, 2013). Por lo tanto, los padres o tutores de los menores fueron informados del propósito, beneficios, confidencialidad y posibles riesgos asociados al estudio. Posteriormente los padres firmaron de manera voluntaria el consentimiento informado y completaron una anamnesis.

Toma de muestras.

De cada adolescente se tomó 12 ml de sangre periférica por venopunción y una muestra de mucosa bucal con un cepillo citológico. Se usaron aproximadamente 6 ml de sangre para el ensayo citoma en linfocitos y 6 ml para las determinaciones bioquímicas. Por otra parte, las muestras de mucosa fueron usadas para el ensayo citoma en células epiteliales bucales. Todas las muestras se transportaron al laboratorio dentro de las 24 h conservándose a 4 °C hasta su procesamiento.

Determinación de parámetros bioquímicos.

Las determinaciones químicas se realizaron con el equipo Cobas®6000 de Roche. Se analizó la concentración de distintos metabolitos en suero (glucosa, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina), el perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos), hepatograma (actividad de enzimas alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y gamma-glutamil transpeptidasa), concentración de iones (fósforo, magnesio y calcio) y actividad de butiril-colinestesterasa (BuChE) como indicador de exposición a compuestos organofosforados y metilcarbamatos.

Ensayo citoma en linfocitos de sangre periférica (LSP).

El ensayo citoma en LSP se realizó según el protocolo de Fenech (2007) con mínimas modificaciones. El primer paso fue el aislamiento de linfocitos de las muestras de sangre mediante el método de separación por gradiente de densidad usando ficoll-hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia).

Posteriormente los linfocitos fueron sembrados en pozos de una placa de cultivo y se incubaron durante 72 horas a 37 °C con 5% CO_2. Luego de 44 horas de incubación se agregó citocalasina B (4,5 µg/mL; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a cada pozo para bloquear la citocinesis (Fenech & Morley, 1985).

Al finalizar las 72 horas las células fueron cosechadas, fijadas con metanol (80%; Merck, Darmstadt, Germany) y teñidas con giemsa (10%; Merck, Darmstadt, Germany). Se registraron 2000 células binucleadas por individuo para determinar la frecuencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares utilizando un microscopio de luz transmitida (Olympus CX31).

Ensayo citoma en células de mucosa bucal (CMB).

El ensayo citoma de micronúcleos en células de la mucosa bucal fue adaptado del protocolo sugerido por Thomas et al. (2009). Inicialmente las muestras de mucosa bucal fueron lavadas tres veces con una solución tampón (0,1 M EDTA, Sigma-Aldrich; 0,01 M Tris-HCl, Sigma-Aldrich and 0,02 M NaCl, Merck). Luego las células fueron fijadas sobre un portaobjetos de vidrio usando metanol (80%; Merck, Darmstadt, Germany) y teñidas con ioduro de propidio (30 µg/mL; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Finalmente, se registraron 2000 células por individuo usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX-40F4). Con base en el registro se calculó la frecuencia de micronúcleos y otras atipias nucleares (células con cromatina condensada, cariorresis, cariolisis, picnosis o binucleadas) de acuerdo con Bolognesi et al. (2013).

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la anamnesis, parámetros bioquímicos y biomarcadores genéticos se analizaron utilizando el software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), considerando un valor alfa de 0,05 y una potencia estadística de 0,8.

RESULTADOS

Características demográficas.

La tabla 1 muestra las principales características demográficas de los participantes del estudio. Con relación a la edad, se observa que el promedio de edad de los adolescentes de Misiones (12,03 años) fue significativamente mayor ($p < 0,001$) que el promedio de edad de los de Buenos Aires (11,17 años). Respecto a las medidas antropométricas, no hubo diferencia significativa entre los grupos para la estatura y el peso o para el índice de masa corporal (IMC) luego de la división de los grupos de acuerdo con el sexo de los adolescentes. Asimismo, no se observó diferencia entre los grupos para la distribución de la variable sexo y la frecuencia de adolescentes que estaban expuestos al humo de cigarrillo en el hogar.

Tabla 1. Principales características demográficas de los participantes del estudio.

Característica	Misiones (n = 30)		Buenos Aires (n = 24)		Valor p
Edad (años, media ± EE)	12,03 ± 0,17		11,17 ± 0,20		0,001*
Peso (Kg, media ± EE)	45,60 ± 2,02		42,65 ± 1,65		0,280
Altura (m, media ± EE)	1,53 ± 0,02		1,49 ± 0,02		0,197
Sexo (%)					
Femenino	18 (60,0)		10 (41,7)		0,273
Masculino	12 (40,0)		14 (58,3)		
IMC por sexo	♀	♂	♀	♂	♀: 0,883
(Kg/m^2, media ± EE)	19,56 ± 0,68	18,96 ± 0,96	19,39 ± 0,89	18,84 ± 0,64	♂: 0,915
Exposición al humo de cigarrillo (%)[a]					
Expuestos (fumador pasivo)	14 (46,7)		11 (45,8)		0,781
No expuestos	13 (43,3)		13 (54,2)		

IMC: Índice de Masa Corporal.
a Algunos datos no fueron proporcionados en la anamnesis.
* Diferencia significativa entre grupos (Prueba t-Student).
Se utilizó la prueba Pearson chi-square para las variables categóricas.

Parámetros bioquímicos.

La tabla 2 muestra los valores de los parámetros bioquímicos en ambos grupos luego de la división de estos de acuerdo con la variable sexo. En primer lugar, cabe destacar que los valores promedio de todos los parámetros evaluados, tanto en el grupo de Misiones como en el grupo de Buenos Aires, correspondían a valores normales para adolescentes sanos con base en los rangos de referencia del Hospital de Clínicas José de San Martín de la Universidad de Buenos Aires.

Tabla 2. Parámetros bioquímicos en sangre de los adolescentes de ambas regiones de acuerdo con el sexo.

Parámetro	Misiones		p^a	Buenos Aires		p^b	Rangos de Referencia	
	Femenino (n = 18)	Masculino (n = 12)		Femenino (n = 10)	Masculino (n = 13)		Femenino (11-14 años)	Masculino (11-14 años)
Glucosa (mg/dL)	79,61 ± 1,74**	85,33 ± 2,13**	0,047*	91,30 ± 2,53	91,85 ± 2,06	0,867	60-100	
Urea (mg/dL)	21,72 ± 1,45	22,67 ± 1,82	0,687	22,20 ± 1,67	23,69 ± 1,21	0,466	10-40	
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,149	0,47 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,049*	≤1	
Colesterol total (mg/dL)	143,39 ± 6,97	131,75 ± 8,47	0,298	155,60 ± 4,31	128,62 ± 6,05	0,003*	Deseable: <170 Límite: 170-199; Alto: >200	
Colesterol HDL (mg/dL)	48,33 ± 4,14	45,83 ± 2,66	0,653	54,00 ± 4,26	45,69 ± 1,89	0,099	Deseable: >45 Límite: 40-45; Bajo: <40	
Colesterol LDL (mg/dL)	85,11 ± 7,32	78,75 ± 7,63	0,565	97,10 ± 5,32	80,54 ± 6,44	0,071	Deseable: <110 Límite: 110-129; Alto: >130	
Índice de Castelli	3,19 ± 0,21	2,95 ± 0,21	0,446	3,04 ± 0,26	2,86 ± 0,16	0,546	<4,5	<5,0
Triglicéridos (mg/dL)	75,83 ± 5,89	61,25 ± 5,10	0,092	77,70 ± 9,60	63,15 ± 5,87	0,221	Deseable: <90 Límite: 90-129; Alto: >130	
Proteínas totales (g/dL)	7,42 ± 0,09	7,45 ± 0,10	0,795	7,17 ± 0,06	7,43 ± 0,10	0,059	6,2–8,1	
Albúmina (g/dL)	4,73 ± 0,06	4,73 ± 0,05	0,970	4,77 ± 0,05	4,80 ± 0,06	0,725	3,6–5,2	
Actividad de ALT (UI/L)	13,00 ± 0,96	20,42 ± 4,00	0,095	11,30 ± 1,37	14,00 ± 1,53	0,217	≤31	
Actividad de AST (UI/L)	20,11 ± 0,87	25,50 ± 2,99	0,051	19,70 ± 0,75	25,42 ± 1,05	<0,001*	≤31	
Actividad de FAL (UI/L)	209,39 ± 19,31**	300,17 ± 25,00	0,007*	281,60 ± 23,68	311,62 ± 20,90	0,353	≤329	
Actividad de GGT (UI/L)	10,44 ± 0,44	10,92 ± 0,63	0,534	9,60 ± 0,94	10,92 ± 0,65	0,248	5-36	
Actividad de BuChE (UI/L)	8.486,78 ± 267,31	8.481,00 ± 382,94	0,990	8.776,20 ± 485,45	9.130,77 ± 299,32	0,522	4260-11250	
Fósforo (mg/dL)	4,56 ± 0,12	4,45 ± 0,19**	0,610	4,67 ± 0,13	5,03 ± 0,13	0,068	2,8–5,3	2,9–5,7
Magnesio (mg/dL)	2,03 ± 0,02**	2,06 ± 0,03	0,467	2,12 ± 0,04	2,14 ± 0,03	0,701	1,6–2,6	
Calcio (mg/dL)	9,71 ± 0,08**	9,61 ± 0,08 **	0,388	9,99 ± 0,08	10,09 ± 0,11	0,459	8,4–10,8	

ALT: alanina transaminasa; AST: aspartato aminotransferasa; FAL: fosfatasa alcalina; GGT: gamma glutamil transferasa; BuChE: butirilcolinesterasa.
Los valores son expresados como media ± EE.
a Significancia entre los valores del sexo femenino y el sexo masculino en Buenos Aires.
b Significancia entre los valores del sexo femenino y el sexo masculino en Misiones.
* Diferencia significativa entre sexos (Prueba t-Student)
** Diferencia significativa con relación al grupo del mismo sexo en Buenos Aires, $p < 0,05$ (Prueba t-Student).

Al analizar las diferencias entre los adolescentes de sexo femenino y masculino en la Provincia de Misiones, solo se observaron diferencias para la concentración de glucosa en sangre (p = 0,047) y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (p = 0,007), siendo mayor en ambos casos para el sexo masculino. Por otra parte, entre los adolescentes de la Provincia de Buenos Aires, la concentración de creatinina en sangre y la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa fueron mayores para el sexo masculino (p = 0,049 y p < 0,001 respectivamente), mientras que la concentración de colesterol en sangre fue mayor para el sexo femenino (p = 0,003).

La comparación de los parámetros bioquímicos entre las adolescentes de sexo femenino de Misiones y de Buenos Aires evidenció valores mayores (p < 0,05) para la concentración de glucosa, magnesio y calcio en sangre, y la actividad de la fosfatasa alcalina en el grupo de Buenos Aires. Asimismo, el análisis entre los participantes del sexo masculino reveló que los valores de glucosa, fósforo y magnesio fueron mayores en los adolescentes de esta región (p < 0,05).

Ensayo citoma en linfocitos de sangre periférica (LSP).

En la tabla 3 se observa la mediana relacionada con la frecuencia de micronúcleos (MN), brotes nucleares (NBUD) y puentes nucleoplásmicos (NPB) en los linfocitos de adolescentes de ambos grupos. Además, se evidenció que la frecuencia de MN y NBUD es mayor en el grupo de Buenos Aires (p = 0,040 y p = 0,002 respectivamente). Sin embargo, se debe resaltar que los valores de estos biomarcadores, tanto en el grupo de Misiones como en el de Buenos Aires, se encontraban dentro de los rangos de referencia propuestos por Fenech (2007) para linfocitos de personas sanas.

Tabla 3. Biomarcadores de genotoxicidad del ensayo citoma en LSP para adolescentes de ambas regiones.

Biomarcador/1000 cells	Misiones (n = 29)	Buenos Aires (n = 15)	Valor p	Rangos de referencia[a]
MN	1,5 [0 - 4]	2,0 [0 - 5]	0,040*	0 - 30
NBUD	0,0 [0 - 1]	0,5 [0 - 2]	0,002*	0 - 5
NPB	0,0 [0 – 1,5]	0,0 [0 – 0,5]	0,246	0 - 10

MN: micronúcleos; NBUD: brotes nucleares; NPB: puentes nucleoplásmicos.
Los valores son expresados como mediana [mínimo - máximo]
a De acuerdo con Fenech (2007).
* Diferencia significativa entre grupos (Prueba U de Mann–Whitney).

Ensayo citoma en células de mucosa bucal (CMB).

La tabla 4 muestra la mediana relacionada con la frecuencia de los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad del ensayo citoma en CMB para los grupos de adolescentes de Misiones y Buenos Aires. Con relación a micronúcleos (MN), se observó una frecuencia mayor de este marcador en el grupo de Misiones (p <0,001), mientras que los valores correspondientes a la frecuencia de brotes nucleares (NBUD), células con cromatina condensada (CC) y células cariolíticas (KYL) fueron mayores en el grupo de Buenos Aires (p < 0,001).

Tabla 4. Biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad del ensayo citoma en CMB para adolescentes de ambas regiones.

Biomarcador/1000 cells	Misiones (n = 30)	Buenos Aires (n = 24)	Valor p
MN	3,5 [0 – 12,5]	0,0 [0 – 1,5]	<0,001*
NBUD	0,0 [0 - 1]	2,0 [0 – 8,0]	<0,001*
BN	0,0 [0 - 3]	1,0 [0 - 4]	0,071
CC	8,5 [1 - 29]	49,0 [15 - 182]	<0,001*
KHC	22,5 [3 - 100]	16,5 [1 - 40]	0,098
KYL	3,0 [0 - 7]	34,5 [2 - 59]	<0,001*
PYK	1,0 [0 - 5]	0,0 [0 - 4]	0,115

MN: micronúcleos; NBUD: brotes nucleares; BN: células binucleadas; CC: células con cromatina condesada; KHC: células cariorréticas; KYL: células cariolíticas; PYK: células picnóticas.
Los valores son expresados como mediana [mínimo - máximo].
* Diferencia significativa entre grupos (Prueba U de Mann–Whitney).

DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios de biomonitoreo en poblaciones expuestas a agroquímicos analizan los efectos de estos compuestos sobre la salud de personas adultas (Bolognesi, 2003; Bull et al., 2006), asumiendo que los agricultores e individuos que manipulan los pesticidas pertenecen a este grupo etario. No obstante, los niños y adolescentes también pueden estar expuestos indirectamente a los agroquímicos cuando estos compuestos son aplicados en cultivos cercanos a sus viviendas. Por lo tanto, el monitoreo de adolescentes en zonas agrícolas es relevante por ser esta una población vulnerable y susceptible a la exposición indirecta a fitosanitarios.

Diferentes factores (anatómicos, fisiológicos y/o del comportamiento) pueden influir en la exposición de los niños a contaminantes ambientales como los agroquímicos (World Health Organization, 2006). Un factor importante es la edad, y en este estudio se observó una diferencia en la media de la edad al comparar esta variable entre los grupos de Misiones y Buenos Aires. Sin embargo, a pesar de esta diferencia, se puede considerar que ambos grupos son comparables puesto que todos los participantes están iniciando su adolescencia y al mismo tiempo su período de pubertad, por lo tanto, todos atraviesan los mismos cambios fisiológicos. La pubertad se asocia con brotes de crecimiento y fluctuaciones hormonales, y los efectos de la exposición química durante la pubertad son en gran parte desconocidos (World Health Organization, 2006).

Adicionalmente, no se evidenció una diferencia significativa entre ambos grupos para la distribución de los sexos y la frecuencia de adolescentes cuyos padres fumaban regularmente en casa. Por lo tanto, se asumió que los adolescentes de Misiones y los de Buenos Aires eran similares respecto a estas características y que las mismas no tendrían mayor influencia al comparar entre grupos los resultados bioquímicos o los biomarcadores utilizados en el estudio.

Una variable que puede influir en los valores de diferentes parámetros bioquímicos es el sexo. En este estudio se dividieron ambos grupos de adolescentes de acuerdo con el sexo para analizar la influencia de esta variable. Como se mencionó anteriormente, los valores de los parámetros bioquímicos evaluados se encontraban dentro de los rangos de

referencia para niños y adolescentes sanos. Sin embargo, fueron notorias algunas diferencias significativas luego de la división por sexos. Por ejemplo, se pudo observar una mayor actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) en los adolescentes de sexo masculino en Misiones en comparación con las participantes de sexo femenino de la misma región. Un comportamiento similar se evidenció para la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) entre los adolescentes de Buenos Aires. De acuerdo con algunos estudios, este patrón dimorfo en la actividad enzimática es característico desde el inicio de la pubertad y está posiblemente relacionado con los cambios hormonales en esta etapa de la vida (Adeli et al., 2015; Turan et al., 2011).

Las diferencias observadas para la concentración de otros analitos en sangre (glucosa, colesterol, fósforo, calcio, magnesio), tanto entre individuos del mismo grupo, pero de sexo diferente como entre participantes del mismo sexo, pero de regiones distintas, podrían estar asociadas a factores como la nutrición y la actividad física de cada individuo (Cardoso Chaves et al., 2013; Huang et al., 2011; Tolfrey, 2002).

Por otra parte, en el monitoreo de personas expuestas a pesticidas organofosforados (OF) y metilcarbamatos (MC), un biomarcador ampliamente utilizado como indicador del efecto de estos compuestos químicos es la inhibición de la actividad de las enzimas colinesterasas, particularmente acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) (Jintana et al., 2009). En este estudio se evaluó la actividad de la enzima BuChE, sin embargo, no se encontró diferencia entre la actividad de los adolescentes de Misiones y de Buenos Aires, lo que podría indicar un bajo nivel de exposición a agroquímicos OF y MC en los adolescentes de Misiones. La baja exposición podría estar relacionada con el tipo de dispersión de pesticidas que se realiza en la zona. En este lugar es común el uso de mochilas dispersoras; este mecanismo minimizaría la deriva de los agroquímicos, la cual es mayor cuando la aplicación de las sustancias se realiza mediante una avioneta. Algunos factores que afectan el flujo de los plaguicidas a través de la atmósfera son la cantidad aplicada, el método de aplicación, las condiciones meteorológicas y las características físico-químicas del producto (Chang et al., 2011; Etiennot & Piazza, 2010).

En el monitoreo de poblaciones expuestas ambientalmente a agentes químicos es común el uso de biomarcadores de efecto sobre biomoléculas como el ADN. Uno de los marcadores de genotoxicidad ampliamente utilizado la prueba de micronúcleos (MN) y su versión más completa que evalúa la frecuencia de diferentes anomalías nucleares (ensayo citoma) en varias matrices, especialmente en linfocitos de sangre periférica (LSP) (Fenech, 2006; Thomas & Fenech, 2011b).

A pesar de que en este estudio se encontró una diferencia significativa para las frecuencias de MN y brotes nucleares (NBUD) en LSP entre los grupos de adolescentes, se debe resaltar que los valores de estos marcadores estaban dentro del rango de referencia propuesto por Fenech (2007) para linfocitos humanos no tratados y la frecuencia basal de MN en niños sanos sugerido por Neri et al. (2005). Por otra parte, la baja frecuencia de estos marcadores de genotoxicidad en los adolescentes de Misiones podría estar asociado con el nivel de exposición bajo a agroquímicos, lo que condice con los resultados de la evaluación de la enzima BuChE.

En los últimos años se ha incrementado el uso de las células de la mucosa bucal (CMB) como una matriz útil para la evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos de diferentes xenobióticos ambientales a través del ensayo citoma en poblaciones infantiles, principalmente porque la toma de la muestra es mínimamente invasiva comparado con el

ensayo en LSP, y no es necesario mantener a las células epiteliales en un cultivo (Holland et al., 2011).

Se considera que las frecuencias de MN y NBUD son biomarcadores que expresan un daño genotóxico, mientras que las células binucleadas (BN) indican fallas en la citocinesis (Thomas et al., 2009). En este estudio la frecuencia de MN fue mayor en el grupo de adolescentes de Misiones, mientras que el número de NBUD fue más alto en los participantes de Buenos Aires. Este resultado contradictorio indicaría que ambos grupos presentan un leve daño genotóxico en las células de la mucosa bucal, pero es posible que el mecanismo molecular causante del daño sea diferente. Esto se presume teniendo en cuenta que los mecanismos de formación de MN y NBUD en linfocitos son distintos (Fenech et al., 2016).

Por otra parte, el ensayo citoma en CMB también permite evaluar biomarcadores de citotoxicidad representados por la frecuencia de células con anomalías nucleares: cromatina condensada (CC), cariorresis (KHC), cariolisis (KYL) y picnosis (PYK) (Thomas & Fenech, 2011a; Thomas et al., 2009). En esta evaluación se observó una mayor frecuencia de CC y KYL en los adolescentes de Buenos Aires. En general, los biomarcadores de citotoxicidad del ensayo citoma en CMB están relacionados con la tasa de recambio del tejido epitelial, es decir con un proceso de muerte celular, por lo tanto, se podría suponer que la tasa de renovación del epitelio bucal es mayor en los participantes de Buenos Aires. Sin embargo, la significancia biológica de estos biomarcadores y su papel en el proceso de descamación celular aún son desconocidos (Thomas et al., 2009).

Adicionalmente, algunos autores han utilizado el ensayo citoma en CMB para evaluar el riesgo de salud de niños y adolescentes que viven en zonas rurales cerca de cultivos fumigados y que están expuestos a agroquímicos. Estos estudios reportan la presencia de daño genotóxico y citotóxico en la población expuesta (Castañeda-Yslas et al., 2016; Gómez-Arroyo et al., 2013). Sin embargo, las frecuencias de algunos de los biomarcadores encontrados en estas investigaciones difieren entre sí, y con los valores del presente estudio.

De acuerdo con lo anterior, en este estudio los resultados de los marcadores de genotoxicidad, citotoxicidad y fallas de la citocinesis en células del epitelio bucal no son contundentes respecto al daño generado por la exposición a agroquímicos. Por lo tanto, se debería aumentar el tamaño muestral de participantes de cada localidad para obtener datos más fehacientes sobre la genotoxicidad y citotoxicidad de la exposición indirecta a los pesticidas.

Finalmente, se puede concluir que, a pesar del limitado número muestral este estudio brinda información importante no sólo para la caracterización del estado de salud y el perfil citogenético de los grupos participantes, sino también para la creación de una base de datos epidemiológicos sobre menores de edad expuestos a agroquímicos en zonas rurales de la República Argentina.

REFERENCIAS

- Adeli, K., Higgins, V., Nieuwesteeg, M., Raizman, J. E., Chen, Y., Wong, S. L., & Blais, D. (2015). Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the canadian health measures survey. *Clinical Chemistry*, *61*(8), 1049-1062. https://doi.org/https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.240515
- Alvarez-Moya, C., Silva, M. R., Ramírez, C. V., Gallardo, D. G., Sánchez, R. L., Aguirre, A. C., & Velasco, A. F. (2014). Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genetics and molecular biology*, *37*(1), 105-110. https://doi.org/https://doi.org/10.1590/s1415-47572014000100016
- Binukumar, B. K., & Gill, K. D. (2011). Chapter 1: Chronic exposure to pesticides-neurological, neurobehavioral and molecular targets of neurotoxicity. In M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the modern world - effects of pesticides exposure* (pp. 3-20). InTech. https://doi.org/https://doi.org/10.5772/943
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *543*(3), 251-272. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *753*(2), 100-113. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., & Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, *21*(2), 93-103. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mutage/gel011
- Cardoso Chaves, O., do Carmo Castro Franceschini, S., Machado Rocha Ribeiro, S., Ferreira Rocha Sant Ana, L., Garçon de Faria, C., & Priore, S. E. (2013). Anthropometric and biochemical parameters in adolescents and their relationship with eating habits and household food availability. *Nutrición Hospitalaria*, *28*(4), 1352-1356. https://doi.org/https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.4.6467
- Castañeda-Yslas, I. J., Arellano-García, M. E., García-Zarate, M. A., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M. G., & Torres-Bugarín, O. (2016). Biomonitoring with micronuclei test in buccal cells of female farmers and children exposed to pesticides of Maneadero agricultural valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*, *2016*, 1-8. https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/7934257
- Chang, F.-c., Simcik, M. F., & Capel, P. D. (2011). Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(3), 548-555. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.431
- Eastmond, D. A., & Balakrishnan, S. (2010). Chapter 11 - Genotoxicity of Pesticides. In R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Third ed., pp. 357-380). Academic Press. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00011-2

- Eddleston, M., Buckley, N. A., Eyer, P., & Dawson, A. H. (2008). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet*, *371*(9612), 597-607. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61202-1
- Etiennot, A., & Piazza, A. (2010). Buenas prácticas de aplicación en cultivos planos extensivos: Distancias a zonas urbanas. Criterios y soluciones. *Acta toxicológica argentina*, *18*(2), 40-53.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *600*(1–2), 58-66. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, *2*(5), 1084-1104. https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T., & Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *770*(Part A), 12-25. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.008
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, *147*(1–2), 29-36. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9
- Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Calvo-González, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S. M., Calderón-Segura, M. E., Martínez-Arroyo, A., Félix-Gastélum, R., & Lagarda-Escarrega, A. (2013). Assessing the genotoxic risk for mexican children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications. *Revista internacional de contaminación ambiental*, *29*, 217-225. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000300008&nrm=iso
- Hernández, A. F., Gil, F., & Tsatsakis, A. M. (2014). Chapter 38 - Biomarkers of chemical mixture toxicity. In R. C. Gupta (Ed.), *Biomarkers in Toxicology* (pp. 655-669). Academic Press. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00038-5
- Holland, N., Fucic, A., Merlo, D. F., Sram, R., & Kirsch-Volders, M. (2011). Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, *26*(1), 51-56. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mutage/geq064
- Huang, J., Frohlich, J., & Ignaszewski, A. P. (2011). The impact of dietary changes and dietary supplements on lipid profile. *Canadian Journal of Cardiology*, *27*(4), 488-505. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjca.2010.12.077
- IARC. (2017). Some organophosphate insecticides and herbicides. In *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* (Vol. 112, pp. 321-412). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Jintana, S., Sming, K., Krongtong, Y., & Thanyachai, S. (2009). Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to

organophosphates. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *82*(7), 833-842. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00420-009-0422-9

- López, S. L., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., Sánchez, N., Simoniello, M. F., & Carrasco, A. E. (2012). Chapter two - pesticides used in south american GMO-based agriculture: a review of their effects on humans and animal models. In C. F. James (Ed.), *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. Volume 6, pp. 41-75). Elsevier. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59389-4.00002-1
- Mensah, P. K., Palmer, C. G., & Odume, O. N. (2015). Chapter 4 - Ecotoxicology of glyphosate and glyphosate-based herbicides—toxicity to wildlife and humans. In M. Larramendy (Ed.), *Toxicity and Hazard of Agrochemicals* (pp. 93-112). InTech. https://doi.org/10.5772/59450
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *268*(2), 157-177. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025
- Neri, M., Ceppi, M., Knudsen, L. E., Merlo, D. F., Barale, R., Puntoni, R., & Bonassi, S. (2005). Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environmental Health Perspectives*, *113*(9), 1226-1229. https://doi.org/https://doi.org/10.1289/ehp.7806
- Thomas, P., & Fenech, M. (2011a). Buccal micronucleus cytome assay. In V. V. Didenko (Ed.), *DNA damage detection in situ, ex vivo, and in vivo: methods and protocols* (pp. 235-248). Humana Press. https://doi.org/DOI: 10.1007/978-1-60327-409-8_17
- Thomas, P., & Fenech, M. (2011b). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. In V. V. Didenko (Ed.), *DNA damage detection in situ, ex vivo, and in vivo: methods and protocols* (pp. 217-234). Humana Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_16
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, *4*(6), 825-837. https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53
- Tolfrey, K. (2002). Intraindividual Variability of Children's Blood Lipid and Lipoprotein Concentrations: A Review. *Preventive Cardiology*, *5*(3), 145-151. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1520-037X.2002.00563.x
- Turan, S., Topcu, B., Gökçe, I., Güran, T., Atay, Z., Omar, A., Akçay, T., & Bereket, A. (2011). Serum alkaline phosphatase levels in healthy children and evaluation of alkaline phosphatasez-scores in different types of rickets. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, *3*(1), 7-11. https://doi.org/https://doi.org/10.4274/jcrpe.v3i1.02
- World Health Organization. (2006). *Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals* (Environmental Health Criteria 237, Issue.
- World Health Organization. (2011). *Summary of principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals* (978 92 4 150117 0). Available at https://www.who.int/ceh/publications/health_risks_exposure_chemicals/en/

- World Health Organization. (2015). *Human biomonitoring: facts and figures*. Available at https://apps.who.int/iris/handle/10665/164588
- World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, *310*(20), 2191-2194. https://doi.org/https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053

ABSTRACT

Most of the studies that evaluate the association between exposure to agrochemicals and health risk focus on the adult population. In contrast, there are few reports involving children and adolescents, although they may be exposed to agrochemicals in rural areas because of the proximity between their homes and crops. Therefore, the aim of this study was to evaluate the health status of a group of adolescents indirectly exposed to agrochemicals and an unexposed group using different biochemical parameters and biomarkers of the cytome assay. The results showed that values of biochemicals parameters from both groups corresponded to those of healthy adolescents. On the other hand, the cytome assay in lymphocytes indicated that the frequencies of micronucleus (MN) and nuclear buds (NBUD) were higher in the unexposed group compared to the exposed group (p = 0.040, p = 0.002 respectively). However, the values of these biomarkers from both groups corresponded to the reference values for healthy individuals reported by other authors. Regarding the biomarkers in epithelial cells from the oral mucosa, the frequency of MN was higher ($p < 0.001$) in the exposed group while the number of NBUD was higher ($p < 0.001$) in the unexposed group. In addition, cells with condensed chromatin and karyolysis were more recurrent in the unexposed group ($p < 0.001$). These results would suggest a genotoxic damage in both groups and a higher renewal rate of the oral epithelium in the unexposed group. However, the biological significance of these markers is still unclear, therefore more studies with a larger sample size are needed to achieve reliable results. In conclusion, this study provided information on the health status of two groups of adolescents from rural areas and contributed to the generation of an epidemiological database of adolescents exposed to agrochemical in Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los adolescentes y sus padres o tutores por su participación en el estudio. Asimismo, a la fundación Alberto J. Roemmers por su apoyo a través del Subsidio para la Investigación Clínica y Epidemiológica (2018 - 2020).

SÍNDOME METABÓLICO Y ALTERACIONES DE LA FERTILIDAD FEMENINA Y PREÑEZ

Gabriela Fabiana Meresman

Instituto de Biología y Medicina Experimental.
IBYME - CONICET

El síndrome metabólico (SM) ha sido redefinido por la *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* como un conjunto de desórdenes fisiopatológicos que comprenden el aumento de al menos 3 de los siguientes factores: obesidad abdominal, presión arterial, triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre. Se ha demostrado además que el SM aumenta el riesgo de sufrir no sólo enfermedades cardiovasculares sino también accidentes cerebrovasculares, diabetes y cáncer [1]. Según la Organización Mundial de la Salud, el 20-25% de la población general padece SM, siendo su frecuencia aún mayor en países desarrollados y población de bajos recursos socioeconómicos [3]. Se sabe además que la prevalencia del SM se ha incrementado exponencialmente en el último tiempo, lo que significa que algunas de las patologías subyacentes al mismo pueden convertirse próximamente en un grave problema de salud. En los últimos años se ha observado que el retraso en la edad en que comienza la búsqueda de embarazo, aumenta la posibilidad de que este síndrome afecte la fertilidad de un individuo. El eje reproductivo es altamente dependiente del balance energético [4] y es por esto que se ha visto un retraso en la pubertad en jóvenes extremadamente delgadas mientras que en jóvenes obesas es muy común la pubertad precoz [5,6]. Es sabido también que el éxito reproductivo depende del correcto funcionamiento de complejos procesos como son la síntesis y acción de hormonas, producción de gametas, ovulación, fertilización, implantación, placentación y desarrollo embrionario. Los desórdenes metabólicos podrían afectar cualquiera de estos procesos comprometiendo la posibilidad de una mujer de lograr un embarazo exitoso, ya sea por efectos directos sobre células u órganos reproductivos, o indirectos a través de otros sistemas [7]. La influencia de cada una de las alteraciones metabólicas asociadas al SM en la reproducción ha sido parcialmente estudiada y son muy pocos los trabajos que evaluaron el SM como una entidad sobre la fertilidad.

El uso de modelos animales que reproduzcan al SM, resultan de suma utilidad para realizar estudios de fertilidad. Se ha reportado que la obesidad impacta negativamente sobre el éxito de la reproducción asistida, causando disminución de embarazos y de nacidos vivos [8–10]. Sin embargo, cabe aclarar que el parámetro asociado a SM no es la obesidad como tal, sino el aumento de la grasa localizada en la zona abdominal. Se ha propuesto la existencia de evidencias indirectas que relacionan la presencia de SM en mujeres jóvenes y disfunciones del eje reproductivo [7]. Además, se advirtió que alteraciones del ciclo menstrual y la oligomenorrea parecen ser más frecuentes en mujeres con SM [11] y que este síndrome se asocia a un aumento al riesgo de padecer complicaciones durante el embarazo como preeclampsia [12]. Por otro lado, estudios realizados en modelos murinos advierten que dietas rica en grasas y azúcares afectan la correcta decidualización endometrial, reducen el tamaño de los sitios de implantación y aumentan el riesgo de

pérdida fetal [13,14]. A pesar de estos datos que sugieren una posible relación entre SM e infertilidad femenina, la mayor parte de los trabajos han evaluado fertilidad en pacientes que se ven afectadas por alguna de las alteraciones que comprende el síndrome, pero no por el SM definido como tal. Un único trabajo ha estudiado muestras de endometrio de pacientes infértiles con SM y ha hallado alteraciones específicas de la expresión génica endometrial durante la ventana de implantación asociadas a la disminución de la tasa de implantación y al aumento de la tasa de abortos espontáneos [15]. Todos estos datos realzan la importancia de un estudio abarcativo, preciso y específico del efecto de esta patología sobre la fertilidad femenina, haciendo hincapié en las alteraciones endometriales e implantatorias.

En lo que respecta a su mecanismo, se han propuesto una serie de hormonas y citoquinas como posibles responsables de los trastornos del eje reproductivo y el SM. Entre ellas, la adiponectina, secretada principalmente por los adipocitos [7,16,17]. Por otro lado, se ha observado que la Metformina, una de las terapéuticas utilizadas frecuentemente en el tratamiento del SM, mejora la ovulación, la tasa de embarazo y la tasa de nacidos vivos modulando la expresión de receptores de hormonas esteroideas en el endometrio de estas pacientes [18,19]. Siendo así se propone como objetivo general ***determinar los efectos del SM y el tratamiento con metformina sobre la fertilidad femenina haciendo hincapié en la comprensión de las alteraciones de la fisiopatología endometrial que pudieran afectar también la preñez temprana.***

MATERIALES Y MÉTODOS Y RESULTADOS

Se realizó un ensayo de proliferación celular en células endometriales estromales T-HESC con el agregado de Metformina (Met), hipoglucemiante más utilizado para el tratamiento de SM siguiendo la técnica de MTT. Se probaron varias concentraciones: 10, 50, 100 y 500 µM. Observamos que la Met no indujo cambios significativos en la proliferación celular estromal endometrial. La concentración de 500 µM resultó tóxica.

Se logró poner a punto un Modelo de decidualización in-vitro: se sembraron células estromales endometriales t-HESC en placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta 80% de confluencia en DMEM / F12 + 10% de FBS charcolizado o en DMEM / F12 + 10% de FBS. Se indujo la decualización tratando células con cAMP 0,5 mM más acetato de medroxiprogesterona (MPA) 10^{-6} M o cAMP 0,5 mM más MPA 10^{-6} M más estradiol 10^{-8} M durante 7 o 9 días. Los diferentes grupos de tratamiento y cultivos de control se observaron y fotografiaron con un microscopio invertido durante todo el período experimental para la documentación. Además, las células de diferentes grupos se cosecharon para la extracción total de ARN para su posterior análisis. Después de 7 días de estimulación de t-HESC con AMPc, MPA y estradiol en medio con FBS charcolizado, se obtuvieron típicas células decidualizadas que se diferenciaron con respecto a las otras condiciones experimentales o al control. Este protocolo parece ser un método confiable para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la decidualización. Estas podrían ser herramientas importantes para avanzar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo del proceso de implantación humana, así como el impacto de otras patologías endocrinas en la salud endometrial, y también podrían ser aplicables al descubrimiento de nuevos fármacos.

Se realizó un ensayo *in vivo* para establecer el modelo del SM en ratones. Utilizamos ratones C57BL/6J hembras de 21 días. Realizamos 6 grupos experimentales con un n=5/grupo: 1) Dieta grasa (DG), utilizamos la dieta importada de USA D12451 de 4.73 kcal/gm y 45kcal%fat de Research Diet, que está reportada que induce SM y no obesidad, 2) Control de DG, utilizamos la dieta importada D12450 10kcal%fat de Research Diets, recomendada como control de la D12450, 3) DG+Metformina (Met) diluida en agua (300mg /kg), 4) Control de DG+Met.) 5) DG pollo (alimento habitual del bioterio standard embebida en grasa de pollo), 6) Control Bioterio (alimento habitual del bioterio standard que contiene 3.128kcal/gr). Se continuó el experimento por un total de 12 semanas completas hasta el sacrificio. La administración de Met se continuó por cuatro semanas (semana 9-12. Todos los animales se pesaron una vez por semana y se determinó la cantidad de comida que ingirieron. Se cicló a los animales por dos semanas. En el momento del sacrificio además se colectó sangre vía intracardíaca para realizar las determinaciones bioquímicas que validan el SM en los animales: niveles de colesterol total, HDL, LDL, y de triglicéridos. Asimismo, se determinaron las concentraciones séricas de LH y FSH por la técnica de RIA. En todos los casos, se analizó el peso y las características histológicas del tejido adiposo visceral, gonadal y subcutáneo (inguinal).

Resumiendo, los resultados obtenidos, podemos decir que hemos hallado diferencias de peso significativas entre los animales alimentados con DG y los controles, a partir de la semana 9 del experimento, momento en que se inició el tratamiento con Met. El porcentaje de grasa y Kcal ingerido fue mayor en los grupos DG. Los niveles de glucemia, colesterol, LDL y triglicéridos no se vieron modificados en este primer experimento. Sin embargo, la dieta grasa provocó un incremento en los niveles de colesterol HDL. El ayuno previo que se realizó antes de las mediciones fue de 4 hs y resultó insuficiente para lograr observar diferencias en estas determinaciones. Este parámetro se corrigió en el segundo experimento in-vivo ayunando a los animales por 6 hs.. Los niveles de LH y FSH, así como el ciclo estral no se modificaron en este experimento piloto. Los animales alimentados con DG presentaron mayor porcentaje de grasa gonadal, subcutánea y visceral, así como mayor tamaño de adipocitos que se cuantificaron por tinción específica y conteo. La Met no modifico ninguno de los parámetros evaluados. Hemos analizado también la histología uterina junto con la médica Patóloga Dra. Ines Stella. El tejido endometrial de los ratones alimentados con DG no presentó modificaciones estructurales. No observamos diferencias significativas en los niveles de proliferación celular endometrial (inmunohistoquímica de PCNA) entre los grupos experimentales.

Asimismo, se realizó un segundo ensayo *in vivo* con modificaciones del primero que involucró 60 animales. Se inició en diciembre de 2019 y culminó en marzo de 2020 con resultados alentadores.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brede, S., Serfling, G., Klement, J., Schmid, S. M. & Lehnert, H. Clinical Scenario of the Metabolic Syndrome. *Visc. Med.* 32, 336–341 (2016).
2. Kuneš, J. *et al.* Epigenetics and a new look on metabolic syndrome. *Physiol. Res.* 64, 611–620 (2015).
3. de la Iglesia, R. *et al.* Dietary strategies implicated in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–21 (2016).

4. Torre, S. Della, Benedusi, V., Fontana, R. & Maggi, A. Energy metabolism and fertility—a balance preserved for female health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 13–23 (2013).
5. Shalitin, S. & Phillip, M. Role of obesity and leptin in the pubertal process and pubertal growth—a review. *Int. J. Obes.* 27, 869–874 (2003).
6. Cruz, J. N. Z. *et al.* Brief report. *Arch Argent Pediatr* 114, 143–146 (2016).
7. Michalakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B. C. & Goulis, D. G. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism: Clinical and Experimental* 62, 457–478 (2013).
8. Maheshwari, A., Stofberg, L. & Bhattacharya, S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 13, 433–444 (2007).
9. Bellver, J. *et al.* Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil. Steril.* 100, 1050–1058.e2 (2013).
10. Provost, M. P. *et al.* Pregnancy outcomes decline with increasing body mass index: Analysis of 239,127 fresh autologous in vitro fertilization cycles from the 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil. Steril.* (2016).
11. Korhonen, S., Hippeläinen, M., Niskanen, L., Vanhala, M. & Saarikoski, S. Relationship of the metabolic syndrome and obesity to polycystic ovary syndrome: a controlled, population-based study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 289–296 (2001).
12. Stekkinger, E., Scholten, R., Heidema, W. & Spaanderman, M. Recurrent pre-eclampsia in women with metabolic syndrome and low plasma volume: a retrospective cohort study. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 122, 1773–1780 (2015).
13. Saben, J. L. *et al.* Excess maternal fructose consumption increases fetal loss and impairs endometrial decidualization in mice. *Endocrinology* 157, 956–968 (2016).
14. Rhee, J. S. *et al.* Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: A potential role for impaired autophagy. *Hum. Reprod.* 31, 1315–1326 (2016).
15. Comstock, I. A. *et al.* Does an increased body mass index affect endometrial gene expression patterns in infertile patients? A functional genomics analysis. *Fertil. Steril.* 107, 740–748.e2 (2017).
16. Chiarugi, P. & Fiaschi, T. Adiponectin in health and diseases: from metabolic syndrome to tissue regeneration. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 193–206 (2010).
17. Angelidis, G. *et al.* The Emerging Roles of Adiponectin in Female Reproductive System-Associated Disorders and Pregnancy. *Reprod. Sci.* 20, 872–881 (2012).
18. Shao, R., Li, X., Feng, Y., Lin, J. & Billig, H. Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 33, 41 (2014).
19. Jungheim, E. S. & Odibo, A. O. Fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: A decision analysis of different oral ovulation induction agents. *Fertil. Steril.* 94, 2659–2664 (2010).

ABSTRACT

The correct functioning of the reproductive axis depends on an adequate energy balance, therefore studying the influence of the physiological alterations associated with metabolic syndrome (MS) as a single entity is important to understand the associated female fertility problems. The aim of this study was to develop and characterize an optimal experimental in vivo model for MS with the future objective of studying the effect of MS on endometrial physiology and reproductive disorders. Twenty one-days-old female C57BL/6 mice were divided in two groups: one received a high fat diet (HF) and the other one, a control diet (CD) for 13 or 14 weeks. Animals were weighed weekly and a significant increase in weight of HF mice was observed at week 11 ($p<0,05$). On the last day of experiment, glycemia was measured using a glucometer with One Touch test strips at two fasting times: 4 h and 6 h, observing a significant increase in HF group after the longer fast ($p<0,01$). Animals were sacrificed at estrus and the blood was collected by cardiac puncture for biochemical analyses of cholesterol, triglycerides, HDL and LDL. The uterine horns, the adipose tissue and the liver were removed and fixed. Significant changes in cholesterol, LDL and HDL were observed in HF mice ($p<0,05$), but no changes were found in triglycerides levels. Adipose tissues were weighed, seeing a significant increase in the weight of visceral and gonadal adipose tissue in HF mice ($p<0,05$). Steatosis was evaluated by haematoxylin-eosin (H-E) staining in liver sections, observing a fatty liver in the HF group. As an approximation to study the reproductive profile, cell proliferation, was assessed by PCNA immunohistochemistry and endometrial glands and leukocytes were count in H-E stained uterine sections in a preliminary experiment, but no changes were observed between groups. These results are promising for the further efforts to evaluate the effect of MS on female reproduction.

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON SOBREPESO/OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON LAS ADIPOCITOQUINAS Y EL ESTADO INFLAMATORIO

Tomás Meroño, Elizabeth Alonso, Laura Kabakian, María Pía Santucci, María Luz Muzzio

Servicio de Diabetes y Nutrición, Complejo Médico Churruca-Visca. Laboratorio Central, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Complejo Médico Churruca-Visca

INTRODUCCIÓN

El estilo de vida sedentario en asociación con el consumo de dietas hipercalóricas ha contribuido significativamente al aumento de la prevalencia de la OB infantil, la cual, en la actualidad, podría ser considerada una pandemia [1]. Datos provenientes de la Encuesta Mundial de Salud Escolar realizada en nuestro país en 2012 reportó una prevalencia de SP y OB de 28,6% y 5,9%, respectivamente, en adolescentes entre 13 y 15 años [2]. A su vez, un estudio que evaluó 1.009 niños (entre 6 y 14 años de edad) de escuelas primarias de la ciudad de Buenos Aires y el Gran Buenos Aires reportó una prevalencia de SP y OB de 16,5% y 16,4%, respectivamente [3]. En concreto, estos datos indican que uno de cada tres niños en edad escolar presentaría SP u OB.

Diversos estudios han demostrado que los niños con exceso de peso tienen mayor probabilidad de convertirse en adolescentes con SP y, posteriormente, en adultos obesos [4,5]. A su vez, las alteraciones metabólicas exhibidas durante la niñez se encuentran asociados al desarrollo de complicaciones clínicas, como hipertensión arterial, diabetes y enfermedad renal y cardiovascular, durante la vida adulta [4,5].

La hiperfiltración renal se ha postulado como uno de los eventos más tempranos en el curso del desarrollo de la patología renal asociada a OB [6]. Si bien los eventos fisiopatológicos que conducen a hiperfiltración en pacientes obesos aún no han sido completamente dilucidados se sabe que cambios hidrodinámicos en la fisiología glomerular, la sobre-activación del sistema renina-angiotensina y el estrés oxidativo contribuyen a su desarrollo [6]. Entre estos cambios tempranos se destaca el aumento de la reabsorción tubular de sodio acompañado de una vasodilatación compensatoria de la arteriola aferente de los glomérulos [6,7]. Estas alteraciones que llevan a un aumento inicial del filtrado glomerular y de la presión glomerular, de sostenerse en el tiempo son las responsables del deterioro de la arquitectura glomerular. El progreso de este fenómeno fisiopatológico es evidenciable a través de una reducción del filtrado glomerular. En última instancia, la glomerulopatía asociada a OB se manifiesta como una esclerosis focal y segmentada que cursa en un 100% de los casos con glomerulomegalia y una proteinuria selectiva de magnitud variable que rara vez alcanza el rango nefrótico[8].

Las evidencias que destacaron a la hiperfiltración como factor de riesgo de deterioro renal son diversas. En adultos de mediana edad, se observó que los pacientes con hiperfiltración presentaron 4 veces más chances de desarrollar albuminuria que aquellos con un filtrado glomerular dentro del rango de referencia [9]. A su vez, en el mismo estudio quienes presentaron hiperfiltración eran más jóvenes (probablemente ligado a lo precoz de este evento) y de mayor peso. Por otro lado, un meta-análisis que incluyó 10 estudios y 720 adolescentes con diabetes tipo 1 describió un riesgo 2,7 veces mayor de nefropatía diabética en los pacientes con hiperfiltración respecto a los pacientes con filtrado glomerular dentro del rango de referencia [10]. Asimismo, otro estudio describió mayor mortalidad asociado a la hiperfiltración en una cohorte de 4231 adultos con diabetes tipo 1 [11]. Por tal motivo, la hiperfiltración comienza a ser destacada como una entidad fisiopatológica cuyo hallazgo no debe ser ignorado [12].

Así como la hiperfiltración se encontró asociada a mayor incidencia de enfermedad renal en diversas poblaciones, otros estudios demostraron que la reducción de peso es capaz de revertir este proceso fisiopatológico [13,14]. Entre estos estudios, los más destacables son aquellos que muestran una normalización del filtrado glomerular, e incluso reversión de la proteinuria, asociado a la reducción de peso ya sea por cirugía bariátrica o por dietas hipocalóricas [13,14]. Así, queda demostrado el rol causal del SP y la OB en las alteraciones de la función renal y, en consecuencia, se destacan las estrategias de mantenimiento y reducción del peso para combatir el aumento de la incidencia de enfermedad renal.

En la literatura, hay pocos estudios realizados en niños y adolescentes con SP/OB sin diabetes que evalúen la presencia de hiperfiltración renal [15–18]. Entre éstos se destaca el estudio realizado por Franchini y col. [18] en el que detectaron una prevalencia de hiperfiltración de ≈16% en niños con OB, similar a lo observado en un grupo de niños con diabetes tipo 1. No obstante, existen resultados controversiales ya que Correia Costa y col. [17] al estudiar una cohorte de 313 niños (48% con sobrepeso/obesidad) entre 8-9 años observaron una reducción del filtrado glomerular asociado al SP/OB, en lugar de hiperfiltración. Por lo tanto, la relación entre el filtrado glomerular y el SP y la OB en niños y adolescentes aún no ha sido completamente dilucidada.

En adultos con OB y glomerulopatía asociada a la OB, la hiperfiltración glomerular se asoció a alteraciones metabólicas y aumento de marcadores inflamatorios [8]. Si estas alteraciones se encuentran también en niños prepuberales con obesidad no se encuentra completamente descrito. Lee y cols. [19] observaron mayores niveles de triglicéridos y marcadores de resistencia a la insulina en adolescentes con hiperfiltración glomerular. Adicionalmente, Di Bonito y cols. [16] mostraron que los adolescentes con obesidad (6-16 years) y un filtrado glomerular alterado (definido por valores > percentil 80 o < percentil 20) presentaban un mayor riesgo de presión elevada, disglucemia y un recuento elevado de glóbulos blancos.

Por otro lado, los ácidos grasos no esterificados (NEFA, del inglés *non-esterified fatty acids*) se encuentran en la intersección de las alteraciones metabólicas y la disfunción endotelial en adultos con OB y/o resistencia a la insulina [20]. Alteraciones en la lipólisis y elevados niveles de NEFA en adultos con OB estuvieron asociados con acumulación ectópica de grasa en diversos órganos, incluidos los riñones [6,21]. El "riñón graso" puede ser una de las posibles explicaciones para la alteración de la función renal asociado a la obesidad [6,21]. Los niveles de NEFA y su asociación con el filtrado glomerular y los marcadores inflamatorios en niños prepuberales no se encuentran del todo estudiados.

Una asociación entre la hiperfiltración glomerular y los marcadores inflamatorios fue sugerida por una correlación entre la actividad de la mieloperoxidasa y el filtrado glomerular en una población portuguesa de niños con SP/OB [22]. No obstante, la mayoría de los estudios evaluando la hiperfiltración glomerular y las quimioquinas, responsables de dirigir las células inflamatorias a los tejidos, fueron realizados en niños y adolescentes con diabetes tipo 1. En particular, en niños con diabetes tipo 1 e hiperfiltración glomerular, se observaron mayores niveles de las quimioquinas MCP-1 (del inglés *monocyte chemoattractant protein*), RANTES (del inglés *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) y eotaxina en comparación con aquellos sin hiperfiltración glomerular [23]. Aún no se conoce si importantes quimioquinas de linfocitos T secretadas por el tejido adiposo, tales como RANTES/CCL5 y la interleuquina-8 (IL-8)/CXCL8, también se encuentran alteradas en niños con hiperfiltración glomerular. Estas quimioquinas parecen estar involucradas en los eventos que relacionan a la OB con las enfermedades cardiovasculares [24–26]. Una última quimioquina que vincula la OB con la enfermedad cardiovascular susceptible de estar alterada en niños con hiperfiltración glomerular es la MIG/CXCL9 (del inglés *monokine induced by interferon-γ*) [27]. Estas quimioquinas podrían estar involucradas en las alteraciones tempranas del filtrado glomerular en niños prepuberales con OB.

Por lo antes expuesto el objetivo del proyecto fue evaluar los niveles de adipocitoquinas y asociarlos a las alteraciones de la función renal en un grupo de niños y adolescentes con SP/OB.

MÉTODOS

Diseño del estudio y sujetos.

La cohorte estudiada fue resultado de un proceso de selección aleatoria de 80 niños prepuberales dentro de un reclutamiento realizado entre los años 2017-2019, en el cual fueron incluidos todos los niños y adolescentes con edad entre 5-17 años con SP u OB que fueron atendidos en el consultorio de Diabetes y Nutrición del Departamento de Pediatría del Complejo Médico Churruca-Visca, Buenos Aires, Argentina. Todos los pacientes y sus padres o representante legal dieron sus consentimientos por escrito antes de su participación en el estudio. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Complejo Médico Churruca-Visca. De los 80 pacientes seleccionados 5 fueron excluídos en base a la presencia de diabetes, hipotiroidismo o tratamiento con levotiroxina, tratamiento para patologías hepáticas, un cociente albuminuria/creatininuria > 30mg/g, signos clínicos de enfermedad inflamatoria, infecciosa o un nivel de proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) > 10mg/l.

Determinaciones clínicas y de laboratorio.

Todos los pacientes realizaron una entrevista clínica en presencia de sus padres o representantes legales en la cual se determinó el peso y la altura. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) y se clasificó a los pacientes en base al valor de IMC según el z-score según las tablas de la OMS [28]. La OB severa fue definida por un z-score IMC > + 3.0. La presión arterial fue medida dos veces luego de 5 minutos de descanso sentado. El promedio de las dos medidas fue utilizado como el valor válido. Para la definición de presión arterial elevada se siguieron las guías de recomendaciones americanas (AAP 2017 guidelines [29]). La circunferencia de cintura se midió en el punto medio entre la cresta

ilíaca y la décima costilla. Se utilizó el percentil 90 de la tabla del Bogalusa Heart Study para definir un aumento de la circunferencia de cintura [30].

Las muestras de sangre se extrajeron por la mañana luego de que los pacientes realicen 12 horas de ayuno, y las determinaciones de laboratorio de rutina se realizaron en un período menor de 24h luego de la extracción. Alícuotas de suero se conservaron a -70ºC para la determinación de las quimioquinas que fueron realizadas en el laboratorio de Medicina Experimental de la Universidad de Pisa, Italia.

Los análisis de laboratorio de rutina se realizaron en un autoanalizador Unicel DxC 800 (Beckman Coulter, USA) por métodos estandarizados. La concentración de Cistatina C se determinó mediante immunoturbidimetría (Diazyme, USA) y la concentración de ácidos grasos libres (NEFA, del inglés *non-esterified fatty acids*) por un ensayo colorimétrico (Randox, UK). Los niveles de proteína C reactiva ultrasensible (hsCRP, del inglés *high sensitivity C reactive protein*) se determinaron por immunonefelometría (Immage, Beckman Coulter, USA). El filtrado glomerular (FG) se estimo mediante la ecuación de Zappitelli combinada, que emplea los valores de creatinina y cistatina C séricos [31]. La presencia de hiperfiltración glomerular (HG) se definió como un valor > 135 ml/min.1.73m^2 [32].

Los niveles séricos de las siguientes quimioquinas secretadas por el tejido adiposo fueron evaluadas por la metodología de ELISA (R&D systems, USA): RANTES/CCL5, MIG/CXCL9 and IL-8/CXCL8.

Los factores de riesgo cardiometabólico fueron definidos empleando los puntos de corte sugeridos por Cook *et al.*, de acuerdo a las modificaciones de la Sociedad Argentina de Pediatría [33]. Los puntos de corte fueron los siguientes: OB abdominal, circunferencia de cintura > 90th percentile; presión arterial elevada, presión sistólica o diastólica > 90th percentile; glucemia alterada en ayunas (GAA), glucosa > 100mg/dl; hipertrigliceridemia (HTG), triglicéridos > 110mg/dl y bajo C-HDL, C-HDL < 40mg/dl.

Análisis estadísticos.

La distribución de las variables cuantitativas fue evaluada por la prueba de Shapiro-Wilks. Las variables con distribución normal se muestran como media ± desvío estándar, y aquellas con distribución no normal como mediana (quartil 1 – quartil 3). De acuerdo a la distribución de las variables se utilizó la Prueba de Pearson o Spearman para evaluar correlaciones entre las variables. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba T de Student o prueba U de Mann-Whitney, según la distribución de las variables. Luego de transformar mediante logaritmo aquellas variables que no cumplían con una distribución normal, se realizaron pruebas de correlación parcial o ANCOVA para ajustar las diferencias por sexo y edad. Para asegurar la validez de los modelos empleados, se verificó la normalidad de los residuos de estos modelos multivariables. Las comparaciones en variables categóricas entre grupos fueron evaluadas mediante prueba exacta de Fisher. Se utilizó el software estadístico SPSS (IBM, USA) 25.0 para todos los análisis. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados con un $p<0.05$.

RESULTADOS

Características de la población y evaluación de la función renal.

La población del estudio fue de 75 niños prepúberes (48% mujeres), de los cuales 13% presentaban SP, 54% OB y 33% OB severa. La prevalencia de los componentes del síndrome metabólico fue: OB abdominal, 73%; bajo C-HDL, 57%; HTG, 39%; presión arterial elevada, 23%; GAA, 9%. El síndrome metabólico se diagnosticó (presencia de 3 o más componentes) en un 32% de los niños y la HG en 16% de ellos. Las características de laboratorio de acuerdo a la presencia o no de HG se muestran en la Tabla 1. Los niños prepuberales con HG presentaron un menor score Z-IMC, NEFA y ácido úrico que aquellos con un FG dentro de los valores de referencia. De acuerdo con estos resultados, el FG presentó una correlación negativa con la edad (r= -0,32; p=0,005), con los niveles de NEFA (r= -0,30; p=0,011) y de ácido úrico (r= -0,29; p=0,011). Estas correlaciones se mantuvieron estadísticamente significativas al ajustar por sexo, y edad y sexo, respectivamente.

Tabla 1. Características generales de la población de niños prepuberales con sobrepeso/obesidad de acuerdo a la presencia de hiperfiltración glomerular (n=75).

	HG (n=12)	FG normal (n=63)	p
Edad (años)	8,2 ± 1,2	9,2 ± 1,7	0,214
Sexo femenino (n,%)	8 (66)	28 (44)	0,212
z-IMC	2,5 (2,0-2,6)	2,8 (2,4-3,7)	0,016*
OB severa (n,%)	0 (0)	25 (40)	0,005
PA elevada (n,%)	2 (17)	16 (25)	0,719
CC (cm)	75±7	84±13	0,054
Glucosa (mg/dl)	90±7	93±7	0,326
HOMA-IR	2,7 (1,4-4,7)	2,2 (1,6-3,8)	0,740
TG (mg/dl)	97 (57-104)	103 (69-140)	0,308
CT (mg/dl)	159 ± 22	166± 29	0,403
C-HDL (mg/dl)	36 (33-43)	38 (33-48)	0,115
C-LDL (mg/dl)	103±17	103±26	0,996
C-no-HDL (mg/dl)	121±23	125±28	0,641
SM (n,%)	3 (25)	21 (33)	0,741
NEFA (mmol/l)	0,69±0,27	0,87±0,26	0,027*
Ácido úrico (mg/dl)	3,7±0,7	4,5 ± 1,0	0,013*
Creatinina (mg/dl)	0,38 (0,36-0,43)	0,47 (0,43-0,53)	0,002*

Cistatina C (mg/l)	0,65±0,08	0,83±0,08	<0,001*
FG (ml/min.1.73m^2)	144±10	113±12	<0,001*
hsCRP (mg/l)	1,5 (0,4-2,9)	2,1 (1,1-5,5)	0,165

IMC, índice de masa corporal; PA, presión arterial; CC, circunferencia de cintura; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; SM, síndrome metabólico; NEFA, ácidos grasos libres, del inglés *non-esterified fatty acids*; FG, filtrado glomerular (estimado según ecuación combinada de Zappitelli). * diferencias que permanecieron estadísticamente significativas al ajustar por sexo y edad. Las variables se expresan como media ± desviación estándar o mediana (Q1-Q3) según la distribución de las variables.

Niveles de quimioquinas y su correlación con la función renal y características metabólicas.

De modo similar a los niveles de hsCRP (Tabla 1), no hubo diferencias en los niveles de quimioquinas entre los niños con HG o no [RANTES: 27,2 (22,4-29,0) *vs,* 26,9 (23,6-30,0) ng/ml; MIG: 420 (329-523) *vs,* 454 (276-686) pg/ml; and IL-8: 551 (311-782) *vs,* 630 (406-922) pg/ml, respectivamente, todas las pruebas p>0,05].

Se observó una correlación inversa entre el FG y los niveles de MIG e IL-8 (r= -0,27, p=0,035; and r= -0,25, p=0,022, respectivamente). Estas correlaciones no se mantuvieron estadísticamente significativas luego de ajustarse por sexo y edad (p>0,05). No se observaron correlaciones significativas entre el FG y los niveles de RANTES (p>0,05).

Las correlaciones entre las quimioquinas y el z-IMC y los niveles de NEFA se muestran en la Figura 1. Mientras que los niveles de RANTES correlacionaron directamente con el z-IMC, los niveles de MIG presentaron una correlación inversa. Adicionalmente, los niveles de MIG correlacionaron positivamente con los NEFA. Por otro lado, los niveles de IL-8 correlacionaron estrechamente con los niveles de MIG (r=0,78; p<0,001), y las correlaciones entre IL-8 y z-IMC y NEFA fueron similares a las de MIG. En modelos ajustados por edad y sexo, solo la correlación entre RANTES y z-IMC y las correlaciones de MIG con z-IMC y NEFA se mantuvieron estadísticamente significativas. Ninguna de las características metabólicas correlacionó con los niveles de quimioquinas. Por último, los niveles de hsCRP presentaron un correlación directa con el z-IMC (r= 0,45; p<0,001) y esta correlación permaneció estadísticamente significativa en modelos ajustados por edad y sexo (p<0,05).

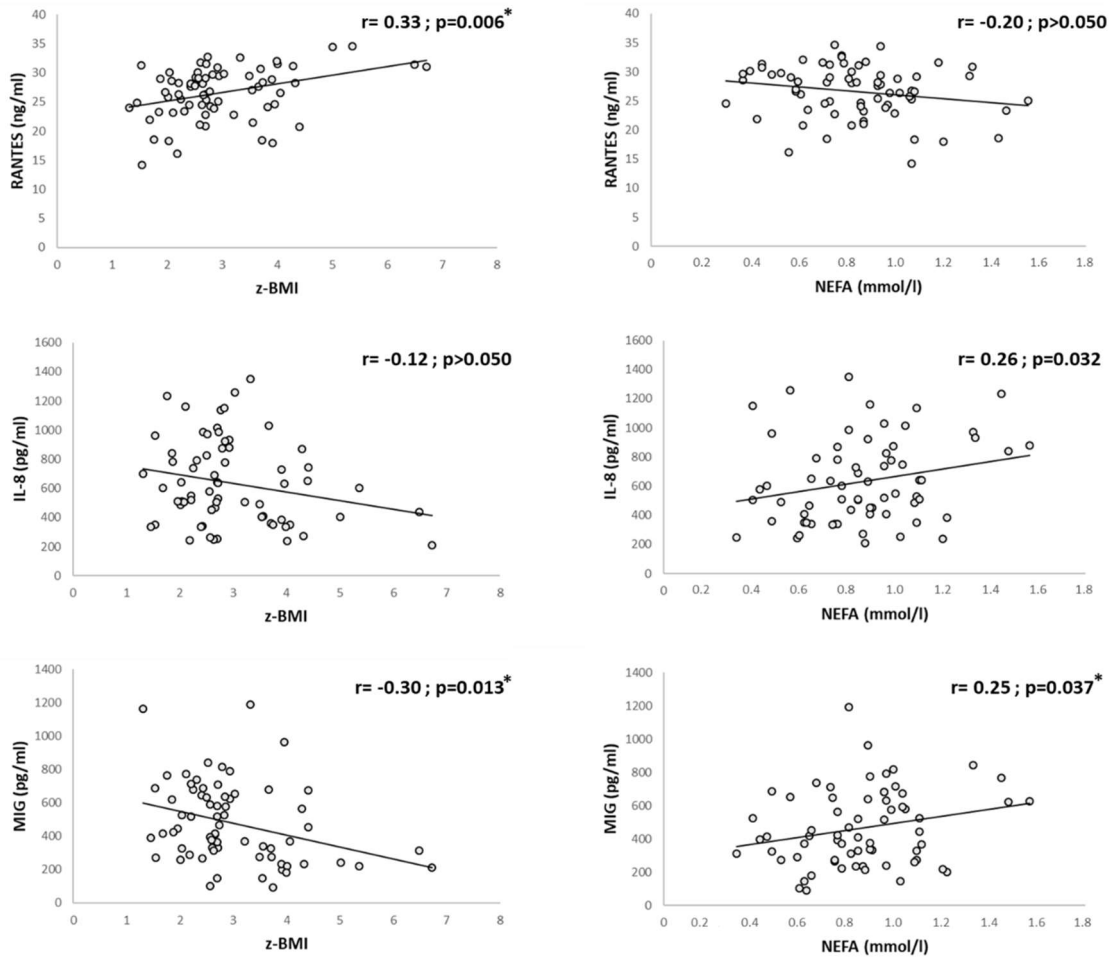


Figure 1. Correlaciones entre las quimioquinas y el z-IMC y los niveles de NEFA (n=75). NEFA, ácidos grasos libres, del inglés *non-esterified fatty acids*; RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; IL, interleuquina; MIG, monokine induced by interferon γ. Los coeficientes y niveles de significancia (p) corresponden a los obtenidos en pruebas univariadas. Coefficients and significance levels shown are those of univariate tests. * pruebas que permanecieron estadísticamente significativas al ajustar por sexo y edad.

Análisis por subgrupos según presencia de obesidad severa.

Los niños prepuberales con OB severa eran más jóvenes y presentaban un peor perfil cardiometabólico en comparación a los otros (Tabla 2). A su vez, estos pacientes no presentaron HG, la que fue observada exclusivamente en aquellos sin OB severa. Paradójicamente, los niños con OB severa presentaron mayores niveles de hsCRP, pero menores niveles de IL-8 y MIG. Estas diferencias en marcadores inflamatorios se mantuvieron estadísticamente significativas en los modelos ajustados por edad y sexo. Adicionalmente, se observaron diferencias significativas en el HOMA-IR y los triglicéridos plasmáticos en modelos ajustados (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las características de los pacientes con o sin obesidad severa.

	OB severa (n=25)	SP/OB (n=50)	p
Edad (years)	8.4 ± 1.6	9.4 ± 1.6	0.014
Sexo femenino (n,%)	8 (32)	28 (56)	0.056
z-IMC	3.9 (3.6-4.4)	2.5 (2.0-2.7)	<0.001*
PA elevada (n,%)	10 (40)	8 (16)	0.042
CC (cm)	86±15	81±11	0.215
Glucosa (mg/dl)	90±8	91±7	0.740
HOMA-IR	3.4 (1.8-6.7)	2.1 (1.4-3.7)	0.013*
TG (mg/dl)	139 (80-154)	93 (68-112)	0.010*
C-HDL (mg/dl)	40 (33-52)	37 (33-44)	0.356
NEFA (mmol/l)	0.78±0.19	0.87±0.30	0.119
SM (n,%)	13 (52)	11 (22)	0.017
Acido urico (mg/dl)	4.5±1.1	4.3 ± 1.0	0.416
Creatinina (mg/dl)	0.45 (0.40-0.48)	0.47 (0.41-0.53)]	0.235
Cistatina C (mg/l)	0.80±0.07	0.80±0.12	0.941
FG (ml/min.1.73m^2)	119±9	118±19	0.758
hsCRP (mg/l)	4.2 (1.5-6.3)	1.5 (0.5-3.8)	0.002*
RANTES (ng/ml)	28.6 (24.2-31.4)	26.3 (23.7-29.1)	0.081
IL-8 (pg/ml)	438 (352-728)	640 (488-932)	0.045
MIG (pg/ml)	294 (220-536)	526 (373-693)	0.002*

SP, sobrepeso; OB, obesidad; IMC, índice de masa corporal; PA, presión arterial; CC, circunferencia de cintura; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; SM, síndrome metabólico; NEFA, ácidos grasos libres, del inglés *non-esterified fatty acids*; FG, filtrado glomerular (estimado según ecuación combinada de Zappitelli). * diferencias que permanecieron estadísticamente significativas al ajustar por sexo y edad. Las variables se expresan como media ± desviación estándar o mediana (Q1-Q3) según la distribución de las variables.

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra como las concentraciones de las quimioquinas plasmáticas asociados a los linfocitos T no fueron diferentes en niños prepuberales según la presencia o no de HG. Mas aun, los niños con HG fueron menos obesos y no mostraron mayores niveles de factores de riego cardiometabólicos. De hecho, los niños con OB severa no mostraron un aumento del FG a pesar de ser más jóvenes. En su conjunto, estos resultados sugieren la existencia de un grupo de niños con OB que presenten un declive precoz de la función renal, en los que la HG pudo haber sucedido a edades más tempranas. Alternativamente, puede ser que la HG no haya podido ser detectada con la definición utilizada en el presente estudio (FG >135 ml/min.1.73m^2). Cualquier sea el caso, esta información es clínicamente relevante ya que los niños prepuberales con SP/OB pueden presentar alteraciones en la función renal que no pueden ser identificadas por los marcadores bioquímicos disponibles.

En esta cohorte de niños prepuberales no hubo correlaciones entre el FG y el z-IMC. Mas aun, en lugar de una correlación positiva, se observó una correlación inversa entre el FG y los niveles de NEFA y acido úrico (que aumentan comúnmente en la OB). Ambos, NEFA y acido úrico no solo se proponen como marcadores de alteraciones cardio metabólicos, sino tambien como mediadores de dichas alteraciones. El ácido úrico elevado se asoció positivamente con hsCRP y marcadores de resistencia a la insulina (datos no mostrados), de modo similar a otros estudios [34]. Por lo tanto, nuestros datos soportan la idea de que la OB y sus alteraciones metabólicas podría conducir a una reducción del FG en lugar de a un aumento. Este resultado contrasta con otros estudios en los que se utilizaron otras ecuaciones para estimar el FG, como la ecuación de Bouvet o la ecuación modificada de Schwartz [18,32,35]. En particular, la ecuación de Bouvet incluye el peso como variable, y por lo tanto es esperable que se encuentren mayores valores en los niños con OB en comparación a aquellos con normopeso [18]. Por otro lado, la ecuación modificada de Schwartz está afectada por un sesgo relacionado a la distribución de masa grasa y magra y su influencia en los niveles de creatinina [35]. A pesar de otras variaciones en los niveles de cistatina C, un rol para la secrecion derivada del tejido adiposo no puede ser despreciada en casos de OB [36]. Nuestros resultados, coinciden con aquellos reportados en una cohorte portuguesa de 313 niños (48% con SP/OB) [17]. En el citado estudio, no solo el FG estimado mediante la ecuación de Zappitelli se correlaciono inversamente con el z-IMC, sino también los valores del clearence de 24horas [17]. Evidencias definitivas sin duda provendrán de estudios longitudinales monitoreando el impacto de la OB infantil en la función renal.

Los niños con OB severa presentaron un peor perfil cardio metabólico y una relación de marcadores inflamatorios paradójica. Mientras que por un lado los niveles de hsCRP fueron mayores, los niveles de MIG se encontraron disminuidos. En este contexto, es destacable que, a su vez, las correlaciones entre estos marcadores y el IMC siguieron esta misma tendencia. así, es posible que mientras que el eje IL-1β - IL-6 - CRP puede estar reflejando un desarrollo incipiente de un estado de inflamación crónica gatillado por la acumulación de grasa [37–40], la correlación entre z-IMC y MIG pueda reflejar una respuesta contrarreguladora adaptativa que involucre a los linfocitos T reguladores (Treg) [41]. Esta respuesta adaptativa Treg se encuentra aumentada en personas con OB en comparación a personas con normo peso y son más importantes en el tejido adiposo subcutáneo que en el tejido adiposo visceral [42,43]. Esta diferencia en las respuestas de las células inflamatorias es relevante para la interpretación de los resultados de este estudio porque en los niños prepuberales con OB la ganancia de peso es por una expansión

preferente del tejido adiposo subcutáneo [44,45]. De hecho, al comparar niños prepuberales con o sin OB las diferencias cuantitativas más importantes son en los depósitos adiposos subcutáneos, y no en los viscerales [40,46]. Adicionalmente, el tejido adiposo subcutáneo en lugar del tejido adiposo visceral, como suele ocurrir en adultos, se asoció a una menor sensibilidad a la insulina y acumulación ectópica de grasa antes de la pubertad [40,46,47]. Por último, la correlación negativa entre los niveles de MIG y los NEFA podría deberse a los conocidos efectos inhibitorios que tiene el interferón-γ sobre la lipolysis [48].

En relación a la IL-8, sus correlaciones con las características metabólicas fueron similares a las correlaciones del MIG. Asimismo, una correlación inversa entre IL-8 y z-IMC ya fue reportada en una cohorte de niños prepuberales [46]. Aunque la expresión de IL-8 se ha demostrado en adipocitos, la estrecha correlación entre los niveles de MIG e IL-8, que fue independiente de IMC, sugiere otra fuente celular. Lo fuente alternativa más probable son los monocitos que podría estar secretando tanto MIG, como IL-8. De hecho, el IFN-γ es un promotor de la secreción de IL-8 y MIG por los monocitos circulantes, en sinergia con otras citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF)-α [49].

El aumento de los niveles de RANTES, y su correlación directa con el z-IMC son coherentes con una mayor infiltración del tejido adiposo por los linfocitos T en consecuencia directa de la expansión desmedida del tejido adiposo [42]. La infiltración del tejido adiposo por los linfocitos T se ha propuesto como uno de los eventos más tempranos en los eventos asociados a la OB [50]. así, el aumento de los niveles de RANTES en los niños con OB podría devuelta estar asociado a una respuesta adaptativa a la OB, debido a que se han atribuido propiedades anti apoptóticas a RANTES en macrófagos residentes del tejido adiposo [51]. No obstante, esta respuesta homeostática inicial al existir una persistencia del aumento del tejido adiposo puede conducir a desbalance de sistemas y a disfunción endotelial. De hecho, mayores niveles de RANTES se asociaron a disfunción endotelial en niños prepuberales [52].

El diseño transversal del estudio no nos permite extraer conclusiones respecto a los mecanismos moleculares detrás de estos hallazgos, y las hipótesis para explicar los resultados observados son especulativas. No obstante, pocos estudios se han centrado en estudiar la relación entre las quimioquinas, NEFA y el FG en niños prepuberales con OB. Adicionalmente, existen menos estudios aun en niños con OB severa, especialmente antes del desarrollo puberal. En el presente estudio un 33% de los niños presentaron un z-IMC en el rango entre 3.03 – 6.72. La evaluación de estos pacientes por separado nos brindó la oportunidad de sugerir un decaimiento del FG en niños con OB como un posible evento temprano en el desarrollo de enfermedad renal. Por otro lado, el número relativamente bajo de pacientes podría ser considerado una limitación e impone la posibilidad de que no se hayan detectado otros resultados interesantes. Entre las fortalezas del trabajo existen dos dignas de mención: a) la exclusión de pacientes con signos clínicos o bioquimicos de inflamación aguda (hsCRP>10mg/l), lo que excluye la posibilidad de que haya un sesgo en los niveles de quimioquinas debido a procesos patológicos, y b) el uso de modelos ajustados por sexo y edad para extraer las conclusiones principales del trabajo.

En conclusión, en niños prepuberales con SP/OB los niveles de RANTES, IL-8 y MIG no se asociaron con el FG. Una disminución del FG, en lugar de un aumento, se asoció a mayor IMC y a peores perfiles metabólicos. Se observaron correlaciones opuestas entre el IMC y los niveles plasmáticos de RANTES y MIG. Estudios longitudinales serían necesarios para poder conocer las implicancias clínicas de estos hallazgos.

REFERENCIAS

[1] Di Cesare M, Sorić M, Bovet P, et al. The epidemiological burden of obesity in childhood: A worldwide epidemic requiring urgent action. BMC Med 2019;17.

[2] OMS. Encuesta Mundial de Salud Escolar 2012.

[3] Hirschler V, Oestreicher K, Maccallini G, Aranda C. Relationship between obesity and metabolic syndrome among Argentinean elementary school children. Clin Biochem 2010;43:435–41.

[4] Koskinen J, Juonala M, Dwyer T, et al. Impact of Lipid Measurements in Youth in Addition to Conventional Clinic-Based Risk Factors on Predicting Preclinical Atherosclerosis in Adulthood: International Childhood Cardiovascular Cohort Consortium. Circulation 2018;137:1246–55.

[5] Macdonald-Wallis C, Solomon-Moore E, Sebire SJ, Thompson JL, Lawlor DA, Jago R. A longitudinal study of the associations of children's body mass index and physical activity with blood pressure. PLoS One 2017;12:e0188618.

[6] Martínez-Montoro JI, Morales E, Cornejo-Pareja I, Tinahones FJ, Fernández-García JC. Obesity-related glomerulopathy: Current approaches and future perspectives. Obes Rev 2022;23.

[7] Strazzullo P, Barba G, Cappuccio FP, et al. Altered renal sodium handling in men with abdominal adiposity: A link to hypertension. J Hypertens 2001;19:2157–64.

[8] D'Agati VD, Chagnac A, de Vries APJ, et al. Obesity-related glomerulopathy: clinical and pathologic characteristics and pathogenesis. Nat Rev Nephrol 2016;12:453–71.

[9] Palatini P, Mormino P, Dorigatti F, et al. Glomerular hyperfiltration predicts the development of microalbuminuria in stage 1 hypertension: the HARVEST. Kidney Int 2006;70:578–84.

[10] Magee GM, Bilous RW, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F, Fogarty DG. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. Diabetologia 2009;52:691–7.

[11] Groop PH, Thomas MC, Moran JL, et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. Diabetes 2009;58:1651–8.

[12] Cortinovis M, Perico N, Ruggenenti P, Remuzzi A, Remuzzi G. Glomerular hyperfiltration. Nat Rev Nephrol 2022;18:435–51.

[13] Navaneethan SD, Yehnert H, Moustarah F, Schreiber MJ, Schauer PR, Beddhu S. Weight loss interventions in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:1565–74.

[14] Morales E, Porrini E, Martin-Taboada M, et al. Renoprotective role of bariatric surgery in patients with established chronic kidney disease. Clin Kidney J 2020;14:2037–46.

[15] Koulouridis E, Georgalidis K, Kostimpa I, Koulouridis I, Krokida A, Houliara D. Metabolic syndrome risk factors and estimated glomerular filtration rate among children and adolescents. Pediatr Nephrol 2010;25:491–8.

[16] Di Bonito P, Sanguigno E, Forziato C, et al. Glomerular filtration rate and cardiometabolic risk in an outpatient pediatric population with high prevalence of obesity. Obesity 2014;22:585–9.

[17] Correia-Costa L, Afonso AC, Schaefer F, et al. Decreased renal function in overweight and obese prepubertal children. Pediatr Res 2015;78:436–44.

[18] Franchini S, Savino A, Marcovecchio ML, Tumini S, Chiarelli F, Mohn A. The effect of obesity and type 1 diabetes on renal function in children and adolescents. Pediatr Diabetes 2015;16:427–33.

[19] Lee AM, Charlton JR, Carmody JB, Gurka MJ, DeBoer MD. Metabolic risk factors in nondiabetic adolescents with glomerular hyperfiltration. Nephrol Dial Transplant 2016;32:gfw231.

[20] Imrie H, Abbas A, Kearney M. Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids 2010;1801:320–6.

[21] Gai Z, Wang T, Visentin M, Kullak-Ublick G, Fu X, Wang Z. Lipid Accumulation and Chronic Kidney Disease. Nutrients 2019;11:722.

[22] Correia-Costa L, Sousa T, Morato M, et al. Association of myeloperoxidase levels with cardiometabolic factors and renal function in prepubertal children. Eur J Clin Invest 2016;46:50–9.

[23] Har R, Scholey JW, Daneman D, et al. The effect of renal hyperfiltration on urinary inflammatory cytokines/chemokines in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. Diabetologia 2013;56:1166–73.

[24] Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. Circulation 2007;115:1029–38.

[25] Kim C-S, Park H-S, Kawada T, et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. Int J Obes 2006;30:1347–55.

[26] Hoch M, Eberle AN, Peterli R, et al. LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-α in human adipocytes. Cytokine 2008;41:29–37.

[27] Youn J-C, Yu HT, Lim BJ, et al. Immunosenescent CD8 $^{+}$ T Cells and C-X-C Chemokine Receptor Type 3 Chemokines Are Increased in Human Hypertension. Hypertension 2013;62:126–33.

[28] de Onis M. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. Bull World Health Organ 2007;85:660–7.

[29] Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, et al. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. Pediatrics 2017;140:e20171904.

[30] Freedman DS, Serdula MK, Srinivasan SR, Berenson GS. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. Am J Clin Nutr 1999;69:308–17.

[31] Fadrowski JJ, Neu AM, Schwartz GJ, Furth SL. Pediatric GFR Estimating Equations Applied to Adolescents in the General Population. Clin J Am Soc Nephrol 2011;6:1427–35.

[32] Bacchetta J, Cochat P, Rognant N, Ranchin B, Hadj-Aissa A, Dubourg L. Which Creatinine and Cystatin C Equations Can Be Reliably Used in Children? Clin J Am Soc Nephrol 2011;6:552–60.

[33] Setton D, Sosa P, Comité Nacional de Nutrición. [Obesidad: guías para su abordaje clínico. Resumen Ejecutivo]. Arch Argent Pediatr 2016;114:180–1.

[34] Valle M, Martos R, Cañete MD, et al. Association of serum uric acid levels to inflammation biomarkers and endothelial dysfunction in obese prepubertal children. Pediatr Diabetes 2015;16:441–7.

[35] Marzuillo P, Grandone A, Di Sessa A, et al. Anthropometric and Biochemical Determinants of Estimated Glomerular Filtration Rate in a Large Cohort of Obese Children. J Ren Nutr 2018;28:359–62.

[36] Naour N, Fellahi S, Renucci J-F, et al. Potential contribution of adipose tissue to elevated serum cystatin C in human obesity. Obesity (Silver Spring) 2009;17:2121–6.

[37] Galcheva S V, Iotova VM, Yotov YT, Bernasconi S, Street ME. Circulating proinflammatory peptides related to abdominal adiposity and cardiometabolic risk factors in healthy prepubertal children. Eur J Endocrinol 2011;164:553–8.

[38] Stoppa-Vaucher S, Dirlewanger MA, Meier CA, et al. Inflammatory and Prothrombotic States in Obese Children of European Descent. Obesity 2012;20:1662–8.

[39] Martos R, Valle M, Morales RM, Cañete R, Gascón F, Urbano MM. Changes in body mass index are associated with changes in inflammatory and endothelial dysfunction biomarkers in obese prepubertal children after 9 months of body mass index SD score loss. Metabolism 2009;58:1153–60.

[40] Maffeis C, Manfredi R, Trombetta M, et al. Insulin Sensitivity Is Correlated with Subcutaneous but Not Visceral Body Fat in Overweight and Obese Prepubertal Children. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:2122–8.

[41] Zeng Q, Sun X, Xiao L, Xie Z, Bettini M, Deng T. A Unique Population: Adipose-Resident Regulatory T Cells. Front Immunol 2018;9:2075.

[42] Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM. Inflammation Correlates With Markers of T-Cell Subsets Including Regulatory T Cells in Adipose Tissue From Obese Patients. Obesity 2011;19:743–8.

[43] Pereira S, Teixeira L, Aguilar E, et al. Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF-β in metabolically healthy class III obese individuals. Nutrition 2014;30:784–90.

[44] Huang TT-K, Johnson MS, Figueroa-Colon R, Dwyer JH, Goran MI. Growth of Visceral Fat, Subcutaneous Abdominal Fat, and Total Body Fat in Children. Obesity 2001;9:283–9.

[45] Gyllenhammer LE, Alderete TL, Toledo-Corral CM, Weigensberg M, Goran MI. Saturation of subcutaneous adipose tissue expansion and accumulation of ectopic fat associated with metabolic dysfunction during late and post-pubertal growth. Int J Obes (Lond) 2016;40:601–6.

[46] Zabaleta J, Velasco-Gonzalez C, Estrada J, et al. Inverse correlation of serum inflammatory markers with metabolic parameters in healthy, Black and White prepubertal youth. Int J Obes (Lond) 2014;38:563–8.

[47] Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Ravussin E, et al. Intrahepatic and intramyocellular lipids are determinants of insulin resistance in prepubertal children. Diabetologia 2011;54:869–75.

[48] Doerrler W, Feingold KR, Grunfeld C. Cytokines induce catabolic effects in cultured adipocytes by multiple mechanisms. Cytokine 1994;6:478–84.

[49] Schrier SB, Hill AS, Plana D, Lauffenburger DA. Synergistic Communication between CD4+ T Cells and Monocytes Impacts the Cytokine Environment. Sci Rep 2016;6:34942.

[50] Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med 2009;15:914–20.

[51] Keophiphath M, Rouault C, Divoux A, Clément K, Lacasa D. CCL5 Promotes Macrophage Recruitment and Survival in Human Adipose Tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:39–45.

[52] Eikendal ALM, Evelein AM V., Uiterwaal CSPM, et al. Relation Between Circulating Inflammatory Chemokines and Vascular Characteristics in Healthy, Young Children. J Am Heart Assoc 2015;4.

ABSTRACT

Background and Aims: Glomerular hyperfiltration (GH) is proposed as one of the earliest events in obesity (OB)-associated renal disease. Children with GH and type-1 diabetes showed increased chemokine levels. Chemokine associations with glomerular filtration rate (GFR) and metabolic features in prepubertal children with overweight(OW)/OB are unknown.

Methods and Results: Cross-sectional study. 75 prepubertal children (aged: 9.0±1.7years) with OW/OB were studied. Clinical and metabolic characteristics (including non-esterified fatty acids, NEFA) and GFR (combined Zappitelli equation) were assessed. GH was defined as GFR>135ml/min.1.73m^2. Serum levels of regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)/CCL5, interleukin-8 (IL-8)/CXCL8 and monokine-induced by interferon-γ (MIG)/CXCL9 were measured by ELISA. Multivariate tests were used to evaluate age- and sex-adjusted correlations and differences, respectively. 48% of the cohort was female and 13% were OW, 54% OB and 33% severe OB. Prepubertal children with GH showed lower z-BMI (-12%), NEFA (-26%) and uric acid (-22%) than those without GH (all $p<0.05$). Similarly to high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), there were no differences in serum chemokines between children with GH or not (all $p>0.05$). Adjusted correlations were significant for RANTES and z-BMI ($r=0.26;p<0.05$) and for MIG with z-BMI ($r=-0.26;p<0.05$) and with NEFA ($r=0.27;p<0.05$).

Conclusion: GH was not associated with higher chemokine levels in prepubertal children with OW/OB. Decreased rather than elevated GFR values were correlated with obesity and worse metabolic profiles. Chemokines levels in children with severe OB suggest a regulation of the immune response. Follow-up studies are needed to address the clinical implications of these findings.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL PROYECTO

Los fondos del proyecto otorgado fueron utilizados en los siguientes estudios publicados en revistas internacionales de alto impacto y prestigio internacional.

1. Santucci MP, Muzzio ML, Peredo MS, Brovarone L, Scricciolo R, Diez C, Andrés-Lacueva C, Kabakian ML, **Meroño T**. Different alterations of glomerular filtration rate and their association with uric acid in children and adolescents with type 1 diabetes or with overweight/obesity. Pediatr Diabetes. 2020;21:657-663**. IF: 4.866 D1 (8/129).** PEDIATRICS.
2. Muzzio ML, Kabakian ML, Morosán-Allo Y, Ferrari, S, Fallahi P, Fernández J, Santucci MP, Andrés-Lacueva C, Antonelli A, Brenta G, **Meroño T**. Association of glomerular hyperfiltration with serum chemokine levels and metabolic features in prepubertal children with overweight/obesity. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2020;30:1188-1195. **IF: 3,700 Q2** (30/89). NUTRITION & DIETETICS.
3. Muzzio ML, Lozano Chiappe ES, Kabakian L, Ferraro F, Landó I, Alonso E, Fernández J, Peredo S, Brovarone L, Pia Santucci M, Meroño T. Effects of Pubertal Status and Inflammation on the Use of Ferritin to Define Iron Deficiency in Children With Overweight or Obesity. Nutr Metab Insights. 2019 Apr 4;12:1178638819839064. doi: 10.1177/1178638819839064. PMID: 31057325; PMCID: PMC6452423. NUTRITION & DIETETICS.

PROCOPIN (PROGRAMA DE CONTROL DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES Y NUTRICIÓN) EN ESCOLARES DE VILLA CORBALÁN DE BERISSO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Marta Cecilia Minvielle, Betina Cecilia Pezzani, María Laura Ciarmela, Alicia Bibiana Orden, Marina Isla Larrain, Josefina Anabitarte, Ana Nuñez, Vanesa Durante, Bernal

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de la Plata

INTRODUCCIÓN

Niñez y adolescencia suponen etapas esenciales en la vida del ser humano caracterizadas por un permanente proceso de crecimiento y desarrollo. Los factores determinantes de la salud infantil irán modelando un período que se inicia en los primeros días de la vida intrauterina y finaliza en torno a los 18 años de vida. Algunos de estos factores serán susceptibles al cambio con medidas costo efectivas y tendrán una trascendente influencia sobre la morbilidad y la mortalidad. Entre las enfermedades prevalentes en la infancia surgen las enfermedades crónicas que van deteriorando lentamente el desarrollo físico e intelectual Los parásitos producen desnutrición proteico-energética, anemia crónica y diarreas graves. Generalmente son de curso crónico y van deteriorando lentamente al individuo parasitado de tal manera que no percibe la afectación de su organismo hasta que alcanza niveles muchas veces irreversible. Anemia, deficiencias de micro nutrientes y enfermedades parasitarias muestran interacciones complejas que se retroalimentan generando un detrimento de la salud, afectando principalmente a niños de países en desarrollo. Varios micro nutrientes tales como hierro, cobre, calcio, magnesio y fósforo modulan la respuesta inmune e influencian la susceptibilidad del huésped a las infecciones. La deficiencia de estos nutrientes posee un efecto amplio en todos los componentes de la inmunidad innata, la inflamación aguda y el desarrollo cognitivo y pondoestatural.

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un proyecto de prevención y control de las infecciones parasitarias (IP) en General Mansilla, partido de Magdalena (2000-2005) logrando la disminución de las IP con la participación activa de la comunidad. Durante 2005, trabajamos en el asentamiento “4 de Junio” de Florencio Varela donde, a pesar de las condiciones precarias, la prevalencia descendió, aportando la concepción: “la pobreza no es sinónimo de parasitosis intestinales”. Hemos participado en los PNVU de las convocatorias 2006, 2007, 2009 2010 y 2012. En los mismos, se trabajó en Berisso con la participación de estudiantes universitarios interactuando con la comunidad, evaluando también el desarrollo pondoestatural. Desde 2009 y hasta el presente hemos desarrollado PROCOPIN (incorporando detección de hemoglobina y evaluación pondoestatural) subsidiado por UNLP, Secretaría de Políticas Universitarias y Fundación Roemmers. Trabajamos con las comunidades de Berisso y Magdalena (2009-2012), Villa Castell (2012), Abasto (2013), El Mercadito (2014) y Malvinas (2015-2017) de La Plata. Durante 2016 y 2017 desarrollamos las actividades en Barrio Obrero y en Villa Progreso de

Berisso. La intervención terapéutica y educativa nos permitió descender las frecuencias de las morbilidades detectadas. Ingresamos a la comunidad a través de los establecimientos educativos y de esta manera llegamos a niños que jamás fueron llevados a la consulta médica aunque tengan signos/síntomas de enfermedad.

El Programa desarrollado con el subsidio de la Fundación Roemmers 2018-2020 se implementó en pre-escolares vulnerables del Barrio "Villa Corbalán" de Berisso. Se realizó en cuatro etapas: 1- Evaluación de las condiciones clínicas- nutricionales y detección de parásitos intestinales. 2- Intervención terapéutica en los niños con alteraciones clínico-nutricionales y/o parasitados y 3- intervención educativa para evitar el retorno al estado de enfermedad y 4- Control post-intervención.

ACTIVIDADES IMPLEMENTADAS

Actividad 1: Se realizaron Jornadas Sanitarias convocadas por los Directivos del Jardín de Infantes Nº 913 de Villa Corbalán de Berisso, provincia de Bs. As. A estas reuniones asistieron los padres/tutores de los niños. El equipo explicó los objetivos del proyecto. Se realizó una encuesta voluntaria individual para evaluar características socio-culturales y clínicas de cada uno de los escolares (con participación de estudiantes universitarios de la UNLP). Se entregaron los recipientes de toma de muestra para el estudio parasitológico. Por experiencias anteriores, los padres y/o tutores de los niños consideran que sus hijos no están parasitados porque no evidencian síntomas agudos de enfermedad. Incluso ellos mismos se consideran libres de parásitos. Al informarles que el análisis es totalmente gratis y voluntario y que con este estudio se aseguran que no tienen parásitos, la convocatoria es importante. De esta manera se logra la concientización de los padres sobre la presencia de niños parasitados en la comunidad.

Actividad 2. Se recolectaron las muestras, se procesaron y se elaboró un informe que se entregó en sobre cerrado a cada padre/tutor. Se extrajo una muestra de sangre (voluntaria, con consentimiento informado) para evaluación de anemia y fórmula leucocitaria. También se realizó el registro de peso y talla e índice de masa corporal para evaluar desnutrición/sobrepeso/obesidad y registro de tensión arterial/frecuencia cardíaca según recomendaciones de la OMS.

Actividad 3: Se confeccionó una base de datos con todos los registros efectuados. Se analizaron las asociaciones entre las parasitosis encontradas, anemia, alteraciones de la nutrición y las características socioculturales y clínicas de cada uno de los encuestados. Se seleccionaron las estrategias de intervención en base a esta información.

Actividad 4: Se realizó tratamiento antiparasitario gratuito individual y selectivo a los escolares parasitados quienes fueron derivados al Centro de Salud Nº 41,42 y 43 de Berisso. También fue gratuito el tratamiento para los casos de anemia. Se convocó a los estudiantes universitarios para participar activamente en los encuentros de promoción de la salud en las comunidades. Los docentes capacitaron a los estudiantes sobre la problemática parasitaria y la manera de evitar la transmisión con cambios en hábitos factibles 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.
Actividad 5: Se desarrolló una Jornada Sanitaria post-intervención y se elevó un informe a las autoridades educativas y sanitarias de la comunidad.

MÉTODOS

Entrevista personal: se realizó una encuesta estructurada y cerrada con cada padre/tutor sobre los siguientes aspectos: demográficos (edad y sexo de los padres y de los escolares; nivel de educación, procedencia y ocupación de los tutores); condiciones sanitarias (tipo de construcción del hogar y del piso, características del baño, recolección de basura, suministro de agua de bebida, disposición de las excretas y hacinamiento) y tenencia de mascotas.

Estudio parasitológico en escolares: se realizó un seriado coproparasitológico y escobillado anal seriado. Las heces fueron procesadas por la técnica de Telemann modificada y los pellets obtenidos observados al microscopio óptico previa coloración con Lugol. Las muestras del escobillado anal se procesaron mediante homogeneización y centrifugación. Finalmente, los sedimentos se observaron al microscopio óptico.

Estudio hematológico: previa explicación del procedimiento a los tutores y a los niños y obtención del consentimiento informado, se realizó la extracción de 5 ml de sangre de vena periférica previa asepsia de la zona. Se determinó fórmula leucocitaria y concentración de Hemoglobina. El valor límite para definir anemia fue 11,5 g/dl (Comité Nacional de Hematología). La gravedad de la anemia fue evaluada según valores diferenciales de la Organización Mundial de la Salud, 2011.

Estudio antropométrico: se realizó un relevamiento antropométrico de los niños previo consentimiento escrito de los padres o tutores. Las mediciones se llevaron a cabo siguiendo protocolos estandarizados. El peso fue registrado en kilogramos con balanza digital de precisión con el niño descalzo y vistiendo ropa ligera. La talla se registró en centímetros empleando un altímetro portátil, con el niño descalzo, de pie y con la cabeza orientada según el plano de Frankfort. La fecha de nacimiento se obtuvo de los registros escolares. Con este dato y la fecha de relevamiento se obtuvo la edad exacta o decimal. Para la determinación del estado nutricional se consideraron tres índices antropométricos: (1) talla para la edad, (2) peso para la edad e (3) índice de masa corporal (IMC). Los datos fueron estandarizados a puntaje Z de la mediana de la referencia OMS 2007 (WHO AnthroPlus 1.02). Las prevalencias de déficit en peso para la edad (P/E), talla para la edad (T/E) e IMC para la edad (IMC/E) se calcularon en base a un valor de z +/-2DS de la mediana de la población de referencia. El sobrepeso y la obesidad se determinaron en base a +1 y +2DS respectivamente.

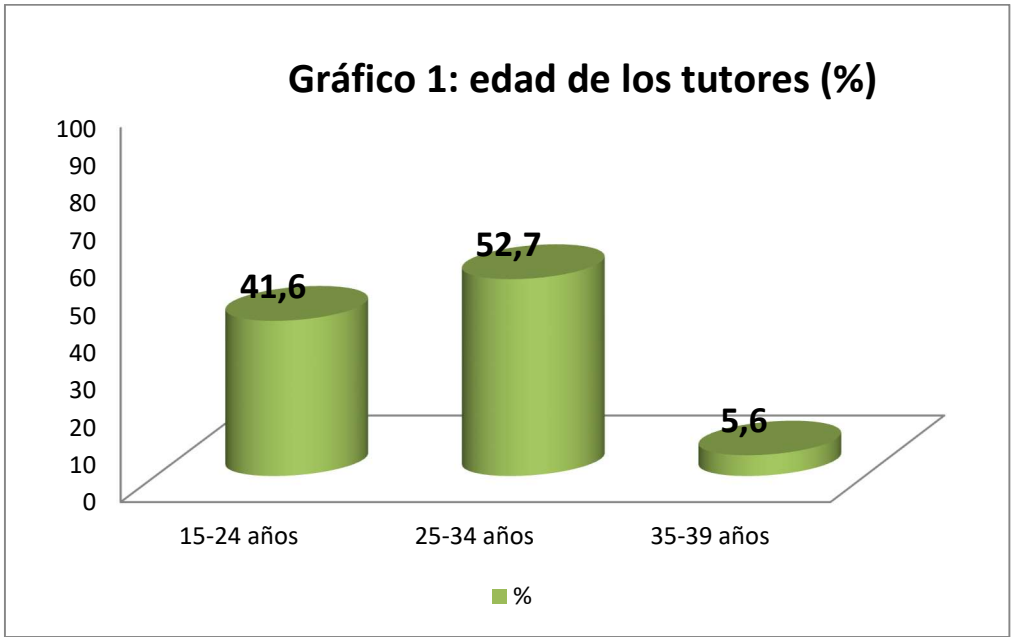
Aspectos éticos: los tutores fueron informados del estudio en forma detallada verbalmente en las reuniones grupales realizadas en la escuela. Los mismos debieron dar su consentimiento en forma escrita y estar presente en el momento de la extracción sanguínea. Los niños cuyos tutores dieron el consentimiento fueron informados acerca del estudio y del procedimiento de extracción de sangre con vocabulario acorde a la edad y se les pidió su aceptación para participar. Los protocolos desarrollados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. La información personal fue confidencial y se actuó de conformidad con la Declaración de Helsinki (1964), el Código de Nuremberg (1947), y la Ley Nacional 25.326. Se obtuvo también la aprobación de las autoridades escolares y municipales del distrito.

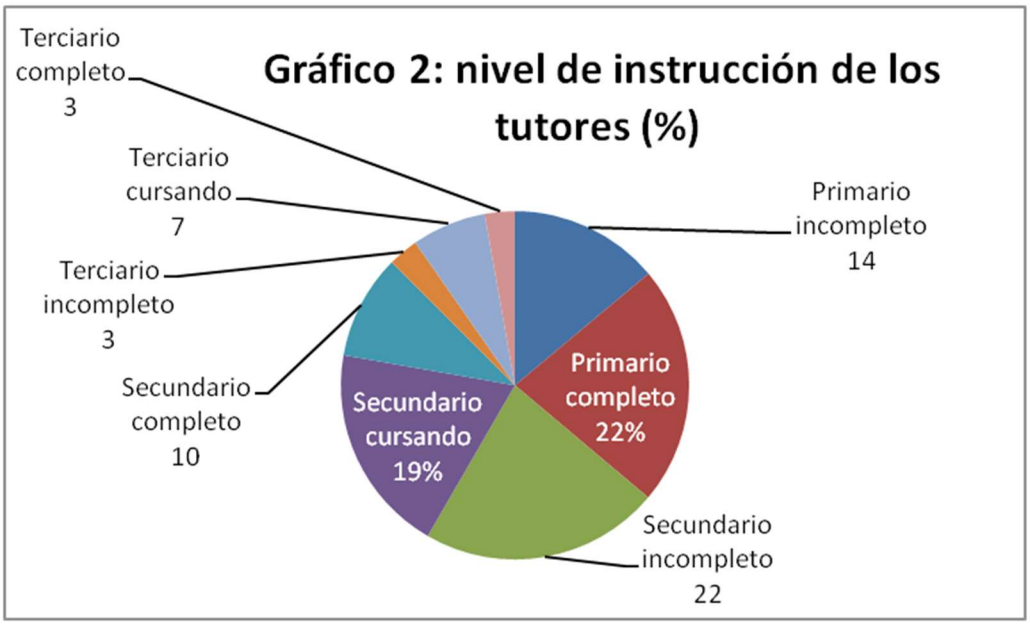
Estadística: para el análisis estadístico se estimaron las frecuencias de anemia, parasitosis total y específicas y variables registradas. Las posibles asociaciones (p> 0,05) se analizaron mediante test de Chi cuadrado y de Fisher. El procesamiento se realizó mediante el programa SPSS19.

RESULTADOS

En la Jornada Sanitaria Inicial implementada en el mes de Noviembre de 2018 concurrieron 72 tutores de los escolares, de los cuales 84,7% fueron mujeres. En los gráficos 1 y 2 se presentan las edades y el nivel de instrucción de los mismos. Respecto a la procedencia de los tutores; 63,9% eran argentinos, 25% bolivianos, 5,6% paraguayos y 5,6% peruanos. Se desempeñaban como amas de casa 30,6%, integrantes de cooperativas 25%, desocupados 2,8% y otros (41,7%).

Respecto a las características de los hogares: presentaron casas de chapa y madera 22,2% y piso de tierra del hogar 1,4%. Las condiciones del baño fueron: 29,2% fuera del hogar y 62,5% inodoro sin acceso al agua. Tenían electricidad 100%, consumían agua de pozo 20,8%, compraban garrafa social 90,3%, no poseían recolección de residuos domiciliarios 2,8%, no había cloacas 60,4%, había zanja en el frente del domicilio 65,5%, no tenían pavimento 62,5% y se anegaban cuando llovía 37,5%. Los datos de convivientes en el hogar fueron: dos (2,8%), tres (12,5%), cuatro (26,4%), cinco (19,4%), seis (13,9%), siete (13,9%9, ocho (5,6%9 y nueve (5,65); registrando 55,6% hacinamiento (más de tres personas por habitación).





Las características socio-sanitarias de los niños que participaron de la Jornada (n=72) fueron: edad y sexo: 77,8% (2-3 años) y 22,2% (4-5 años) de los cuales 37,5% eran niñas. Su país de nacimiento fue: 94,4% Argentina, 2,8% Perú, 1,4% Bolivia y 1,4% Paraguay.

En la Tabla 1, se observan las conductas de riesgo sanitario de los niños

Tabla 1: Conductas de riesgo sanitario de los niños encuestados (n=72

Variable	N	(%)
No lava manos antes de comer	34	(52,2)
No lava manos después de ir al baño	37	(49,6)
Onicofagia	20	(27,8)
Succión dedo	13	(18,1)
Juega con tierra	45	(62,5))
Juega con arena	45	(62,5)
Juega con mascotas	53	(73,6)
Anda descalzo	31	(43,1)

Las manifestaciones clínicas referidas por los tutores respecto a los niños (n=72) fueron las siguientes: dolor abdominal (43,1%), diarrea (15,3%,) vómitos (9,7%), prurito anal (47,2%), pérdida del apetito (31,9%), decaimiento (2,1%) y bruxismo (88,9%).

En la Tabla 2, se presentan los datos de sedentarismo en los niños.

Tabla 2: horas por día frente a pantallas (televisión, tablets, consolas de juego, teléfonos celulares). (n=72)

Hrs/día	%
1-2	40,3
3-4	56,9
5 o +	6,9

Realizaron la toma de muestra adecuada para evaluación de parásitos intestinales 58 escolares. Resultaron 38/58 (65,5%) niños parasitados. La frecuencia específica de parásitos fue la siguiente: *Blastocystis hominis* (13,2%), *Enterobius vermicularis* (68,4%) y *Giardia intestinalis* (26,3%).

Se realizó la evaluación pondo-estatural en 72 niños, registrando 1,4% bajo peso para la edad, 5,6% baja talla para la edad, 20,9% sobrepeso y 5,6% obesidad. Respecto a la tensión arterial, sobre 72 escolares, un niño presentó elevada TA. Se extrajo sangre a 32 escolares de los cuales un solo niño presentó anemia leve. Todos fueron derivados a partir de la entrega de resultados a la Unidades Sanitarias, para su tratamiento individual y específico.

Luego de la intervención farmacológica específica e individual de los niños, se realizó la Jornada Educativa. Y por último, la Jornada Sanitaria Control.

En noviembre de 2019 se realizó la Jornada Sanitaria Control. Concurrieron 62 tutores de los escolares. Realizaron la toma de muestra adecuada para evaluación de parásitos intestinales 40 escolares. Resultaron 42,5% niños parasitados. La frecuencia específica de parásitos fue la siguiente: *Blastocystis hominis* (22,5%), *Enterobius vermicularis* (25%) y *Giardia intestinalis* (7,5%).

Se realizó la evaluación pondo-estatural en 62 niños, registrando 3,2% bajo peso para la edad, 4,8% baja talla para la edad, 16,2% sobrepeso y 4,8% obesidad. Respecto a la tensión arterial, un niño presentó elevada TA.

Las manifestaciones clínicas referidas por loa tutores respecto a los niños fueron: dolor abdominal (43,5%), diarrea (14,5%), vómitos (8%), prurito anal (35,5%), pérdida de apetito (29%), decaimiento (14,5%) y bruxismo (67,1%).

Respecto a horas frente a pantalla: 1-2 hrs/ día (40,3%), 3-4 hrs/día (51%) y cinco o más horas (8,1%).

Todos los niños con resultados alterados fueron derivados a las Unidades Sanitarias, para su tratamiento individual y específico.

En los gráficos 3 y 4 se presentan los resultados comparativos de los análisis parasitológicos y de la evaluación pondoestatural de los niños obtenidos en la Jornada sanitaria Inicial y de Control.

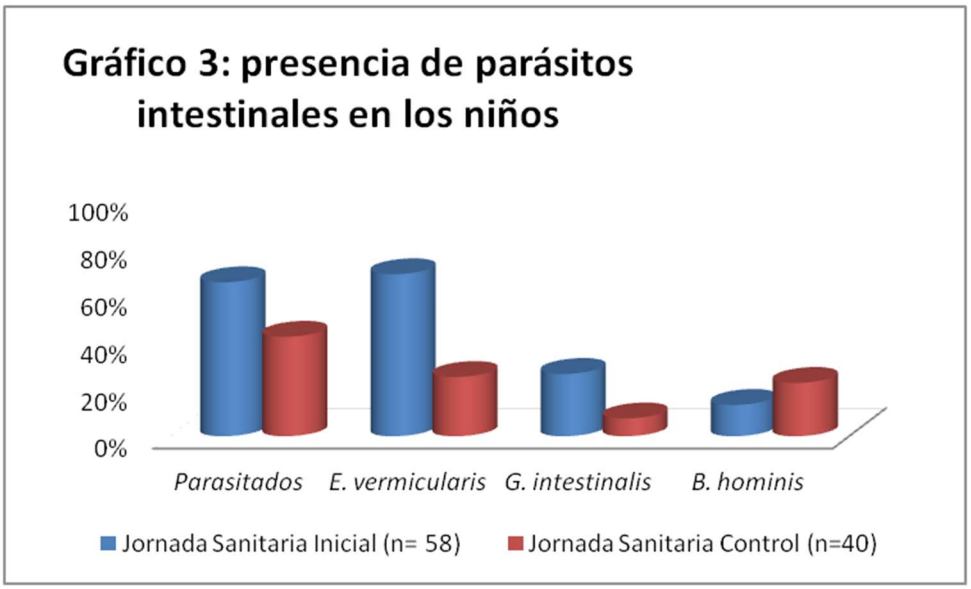
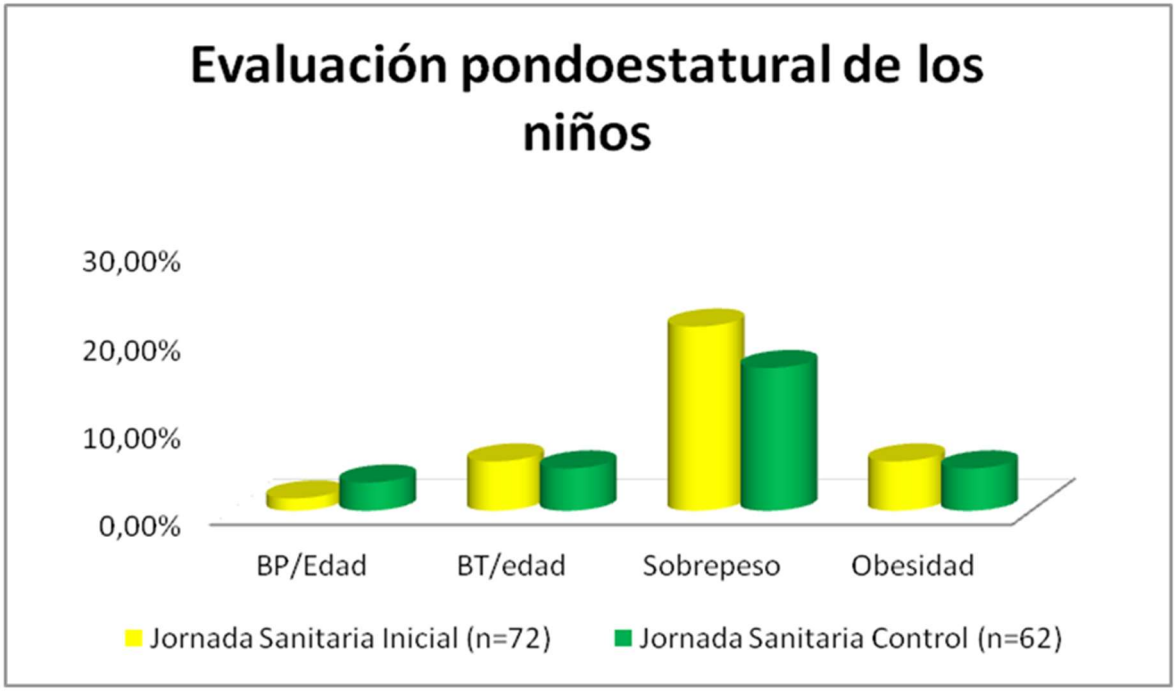


Gráfico 4



ANÁLISIS DE DATOS

La ejecución del programa PROCOPIN evidenció una prevalencia parasitaria superior al 65% en niños de comunidades vulnerables del noroeste de la provincia de Buenos Aires. Encontramos que los protozoos *G. intestinalis* y *B. hominis* estaban presentes en 31,6% de los niños parasitados y el helminto *E. vermicularis* en dos de cada tres niños.

Las variables socio sanitarias asociadas con la presencia de parásitos en las personas fueron: casa de madera o de cartón-chapa, excretas sin conexión a cloacas, baño fuera de la vivienda y más de seis convivientes en el hogar.

Las parasitosis intestinales disminuyeron después de la intervención terapéutica y educación para la salud, en general, y en especial para *E. vermicularis y G.intestinalis*.

Por el contrario, *B.hominis* aumentó significativamente. Las probables causas de este resultado podrían asociarse a la contaminación del agua de pozo de los hogares que generó la reinfección en los niños.

Si bien existe una disminución en la carga parasitaria es importante hacer notar que el tratamiento no rompe con el ciclo de infección y reinfección de la población en estudio, si bien una solución a corto plazo es la administración de antiparasitarios la solución a largo plazo estaría en función a proveer agua potable, saneamiento del ambiente, higiene y educación continua sobre la forma de infección y prevención de los parásitos.

Respecto a las manifestaciones clínicas, observamos que en nuestra población no hubo asociación entre presencia de signos/síntomas (S/S) y parasitismo cuando se analiza el total de los niños. No obstante, cuando analizamos el número de S/S, los niños agrupados con dos, tres o más S/S presentaron asociación con parasitosis intestinal respecto a aquellos no parasitados.

Analizando el desarrollo pondoestatural, las variables baja talla para la edad, sobrepeso y obesidad evidenciaron mejores resultados. Por el contrario, bajo peso para la edad aumentó, pues hubo niños que si bien crecieron, no progresaron del mismo modo en su peso, reflejando que no han recibido una dieta alimentara adecuada.

La cantidad de horas frente a pantallas (sedentarismo en niños) no tuvo grandes variaciones. Si bien en las entrevistas con los padres insistimos en la importancia de que ingresaran a sus hijos al club del barrio para iniciarse en algún deporte, los mismos manifestaron que no podían hacerse cargo de las cuotas de todos sus hijos; y seleccionaban a los hijos mayores.

Este estudio proporciona datos sobre el impacto de las intervenciones comunitarias en el campo de la salud infantil en el área de los parásitos intestinales y desarrollo pondoestatural presentes en niños de grupos sociales desfavorecidos. Nuestros resultados indican que el tratamiento farmacológico específico e individual de los niños en edad preescolar disminuyó las frecuencias parasitarias. Hubo un menor impacto en el desarrollo pondoestatural que involucra una intervención en la alimentación de los niños. Sin embargo, será necesario implementar estrategias educativas en la comunidad para involucrar a la comunidad en el control de estas infecciones. La solución a largo plazo dependerá de la intervención municipal para mejorar las condiciones sanitarias de las viviendas y su entorno; teniendo en cuenta que la inversión en salud infantil reduce las tasas de deserción escolar y aumenta la probabilidad de completar la educación básica, permitiendo acceder a mejores empleos en el futuro.

REFERENCIAS

-Borjas, P., Arenas F, Angulo Y. Enteroparasitismo en niños y su relación con la pobreza y estado nutricional. Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana 14 (1): 49-54, **2009**. ISSN Print: 1992-4240, ISSN Online: 1680-8398.

-Brandelli C, Giordani R, Carli G, Tasca T. Indigenous traditional medicine: in vitro anti-Giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. Journal of Parasitology Research 104: 1345-1349, **2009**. ISSN: 2090-0023 (Print) ISSN: 2090-0031 (Online) DOI: 10.1155/9582.

-Cardona-Arias JA. Determinantes sociales del parasitismo intestinal, la desnutrición y la anemia: revisión sistemática. Revista Panamericana de Salud Pública 41: 1-9, **2017.** ISSN Print: 1020-4989. ISSN Online: 1680 5348. DOI: 10.26633/RPSP.2017.143.

-CDC (Center for Disease Control and Prevention). Atlanta, GA: CDC. Parasites. https://www.cdc.gov/parasites/about.html, **2018**.

-Chard A, Gran J, Chang H, Clasen T, Freema M. Impact of a school-based water, sanitation, and hygiene intervention on school absence, diarrhea, respiratory infection, and soil-transmitted helminths: results from the WASH HELPS cluster-randomized trial. Journal of Global Health 9 (2): 1-14, **2019**. ISSN Print: 2047-2978. ISSN Online: 2047-2986. doi: 10.7189/jogh.09.020402.

-Faria C, Zanini G, Dias G, da Silva S, de Freitas M, Almendra R, Santana P, Sousa M. Geospatial distribution of intestinal parasitic infectionsin Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. PLoS Negl Trop Dis 11(3): 1-21, **2017**. e0005445.https://doi.org/10.1371/journal. pntd.0005445.

-Fishbein, M, Ajzen I. Predicting and changing behavior: the reasoned action approach. New York, Psychology Press (Taylor & Francis Group), **2010.** ISBM: 978-0-8058-5924-9.

Gimenez A, Chuquimia M, Salamanca E, Llanos F, Limachi I et al. Pilot study of intestinal parasitosis diagnostic and response to Mebendazol on school age children at schools in Charcas II, El Sillar and La Cascada, year 2010 La Paz. Revista Con-Ciencia 1 (6): 37-49, **2018**. ISSN Online: 2310-0265.

-Grandes G, Sanchez A, Cortada J, PomboH, Martinez C e al. Collaborative modeling of an implementation strategy: a case study to integrate health promotion in primary and community care. BMC Research Notes 10 (699):1-12, **2017**. https://doi.org/10.1186/s13104-017-3040-8.

-Jukes M, Drake L, Bundy D. School health, nutrition and education for all. Lleveling the playing field, **2008**. CABI Publishing. Oxfordshire OX10 8DE. United Kingdom. ISBN 978-1-84593-311-1.

-Kim D-H, Yu HS. Effect of a One-Off educational session about Enterobiasis on knowledge, preventative practices and infection rates among schoolchildren in South Korea. PLoS ONE 9(11): 1-8, **2014**. doi:10.1371/journal.pone.0112149.

-Minvielle M, Lozano M. "Detección de genotipos de *Giardia intestinalis* en Argentina". Editorial Académica Española isatrademark of: Ovni ScriptumGmbH & Co.KG. Bahnhofstraße 28, D-66111 Saarbrücken Think Tank: Haroldstr. 14, D-40213 Düsseldorf, Germany, **2016**. ISBM 978-3-659-70358-4.

-Navone G, Zonta M, Cociancic P, Garraza M, Gamboa M, Giambelluca L, Dahinten S, Oyhenar E. Estudio transversal de las parasitosis intestinales en poblaciones infantiles de Argentina. Revista Panamericana de Salud Publica 41:e24:1-9, **2017**. ISSN Print: 1020-4989. ISSN Online: 1680 5348.

-OMS. Desarrollo de la primera infancia: un potente ecualizador. Informe Final. Comisión de los determinantes sociales de salud, **2007**. https://www.who.int/social_determinants/publications/early_child_dev_ecdkn_es.pdf

-Pérez R, Valdez E, Cubillas M, Cota L, Morales G. Aplicación de un modelo educativo para prevenir parasitosis intestinal. (Implementing an educational model to prevent intestinal parasitism). Revista Estudios Sociales XXII (44): 92- 117, **2014**. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C Mexico. ISSN On line: 2395-9169.

-Ramírez J, Flórez C, Olivera M, Bernal M, Giraldo J. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. PLoS One 12(2): 1-13. **2017**. doi: 10.1371/journal.pone.0172586 PMCID: PMC5319748PMID: 28222192.

-Salamanca E, Arevalo D, Fernandez F, Nina N, Limachi I, et al. Deworming in children of rural schools 2016-2017: Diagnosis and Treatment of intestinal enteroparasites in Sapecho A School - Sud Yungas, La Paz. Revista Con-Ciencia 1 (6):27-36, **2018**. ISSN Online: 2310-0265.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS ASOCIADOS AL PROGRAMA IMPLEMENTADO

Comunicaciones en reuniones científicas**:**

- "Mejoramiento de la calidad del agua de consumo e intervención terapeútica y educativa como estrategias para el control de las parasitosis intestinales". Pezzani BC, Ciarmela ML, Chiodo PG, Zubiri K, De Andrea MJ, Ceccarelli S, Nuñez A y Minvielle MC. XXIV Jornadas sobre Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes. XXII Jornadas sobre Cambio Global y Desarrollo Sustentable. La Plata, 5-7 Noviembre de 2018.

- "Parasitosis y Nutrición". Minvielle M, Pezzani B, Ciarmela L, García Silvia, Orden A, Nuñez A, Isla Larrain M, Martinez C, Rosa D, Zubiri K, Ceccarelli S, De Andrea M, Chiodo P, Taboada A. XXIV Jornadas sobre Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes. XXII Jornadas sobre Cambio Global y Desarrollo Sustentable. La Plata, 5-7 Noviembre de 2018.

- "¿**Están las parasitosis Intestinales relacionadas con la obesidad?** Orden A, Chiado G, Estrada R, Apezteguía M, Ciarmela M, Pezzani B, Minvielle M. Sociedad Argentina de Pediatría. 1º Jornadas Nacionales de Desarrollo. 20-22 de mayo, CABA. 2019.

- "Intervención farmacológica y educativa para el control de las parasitosis intestinales en población preescolar de la provincia de Buenos Aires. Minvielle M, Zubiri G, Ceccarelli S, De Andrea M, Sala J, Ciarmela M, Pezzani B. XIX Simposio Internacional sobre Enfermedades Desatendidas. 20-22 de agosto de 2019.

- **"Precisión diagnóstica de la circunferencia de cintura para la identificación de sobrepeso y obesidad en niñas y niñoa preescolares"**. García S, Bertolotti M, Orden A, Ciarmela M, Pezzani B, Sala J, Kraus G, Vargas Ferruvino V, Minvielle M. XX Jornadas de Pediatría. 17-18 de octubre. La Plata, 2019.

- **"Intervención farmacológica, educativa y sanitaria para el control de giardiasis en pre-escolares de un barrio periférico de la provincia de Buenos Aires"** Ciarmela ML, Pezzani B, García S, Chiodo P, Isla Larrain M, Rosa D, Kraus G, Sala J, Minvielle M. VII Congreso Hospital Muñiz, 13-15 Noviembre, CABA, 2019.

- "Estudio comparativo de las parasitosis intestinales en niños de dos barrios periféricos-". Kittler NM, Ciarmela ML, Pezzani BC, Minvielle MC. XX Simposio Internacional sobre Enfermedades Desatendidas. 2, 3 y 4 de noviembre 2021 Modalidad virtual. Mundo Sano, Libro de Resúmenes, pag. 31.

- Pluralidad de variables asociadas a parasitosis intestinales en niños de Jardines de Infantes de Berisso, provincia de Buenos Aires". Ciarmela MM, Pezzani BC, Urrutia MI, Minvielle MC. IX Congreso Argentino de Parasitología. Asociaciación Parasitológica Argentina. Libro de Resúmenes, *pág*. 152. Salta 6/ 2022.

Trabajos publicados:

-"Intestinal parasitoses and clinical manifestations found in 3 to 12 years old schoolchildren in Argentina". Zubiri K, Ceccarelli S, De Andrea M, Ciarmela M, Pezzani B, Bonzo E, Minvielle M. Journal Of Health Sciences And Nursing 3 (6):20-33, 2018.

- "Pharmacological and educational intervention for the control of intestinal parasitic infections in the pré-school children in Argentina". Mínvielle Marta, Zubiri Karina, De Andrea María, Ceccarelli Soledad, Ciarmela María and Pezzani Betina. World Journal of Advance Healthcare Research. 4 (4): 150-158, 2020.

RESUMEN

Este trabajo compara los resultados de dos años de intervención farmacológica y educativa (2018-2020) para el control de parásitos intestinales y el desarrollo pondoestatural en preescolares de Berisso, Argentina. Se realizó un estudio ecológico exploratorio. Se evaluaron en una Jornada Sanitaria Inicial las condiciones socio-clínicas-ambientales de los niños y presencia de parásitos intestinales. Con los resultados obtenidos, los niños con alguna alteración fueron derivados a la Unidad Sanitaria Municipal para su tratamiento individual y específico. Luego de realizar la intervención terapéutica de los niños parasitados, se implementaron talleres educativos para evitar el retorno al estado de enfermedad y finalmente, el control post-intervención. En 2018, 72 preescolares del Jardín de Infancia completaron todas las etapas del programa. En 2019, 62 lo hicieron. En 2018 registramos 65,5 % de niños parasitados, detectando *Enterobius vermicularis*, *Giardia intestinalis* y *Blastocystis hominis*. En 2019 registramos una disminución de niños parasitados (42,5%); siendo mayor el impacto en *E.vermicularis* y *G.intestinalis*. En cuanto al desarrollo pondoestatural, las variables baja talla para la edad, sobrepeso y obesidad mostraron mejores resultados luego de la intervención; pero no ocurrió lo mismo con sedentarismo. Las estrategias implementadas han tenido buenos resultados con la prevalencia general de parasitosis y desarrollo pondoestatural, pero han sido deficientes con respecto a las modificaciones en el sedentarismo de los niños. Aspectos que debemos tener en cuenta para mejorar futuras intervenciones en la comunidad.

Palabras clave:

Parasitosis intestinales y desarrollo pondo estatural. Intervención terapéutico-educativa. Niños preescolares. Argentina

Trabajos publicados asociados al proyecto desarrollado:

-"Intestinal parasitoses and clinical manifestations found in 3 to 12 years old schoolchildren in Argentina". Zubiri K, Ceccarelli S, De Andrea M, Ciarmela M, Pezzani B, Bonzo E, Minvielle M. Journal Of Health Sciences And Nursing 3 (6):20-33, 2018.

- "Pharmacological and educational intervention for the control of intestinal parasitic infections in the pré-school children in Argentina". Mínvielle Marta, Zubiri Karina, De Andrea María, Ceccarelli Soledad, Ciarmela María and Pezzani Betina. World Journal of Advance Healthcare Research. 4 (4): 150-158, 2020.

SUMMARY

This work compares the results of two years of pharmacological and educational intervention (2018-2020) for the control of intestinal parasites and weight and height development in preschool children from Berisso, Argentina. An exploratory ecological study was carried out. The socio-clinical-environmental conditions of the children and the presence of intestinal parasites were evaluated in an Initial Health Meeting. With the results obtained, the children with some alteration were referred to the Municipal Health Unit for their individual and specific treatment. After carrying out the therapeutic intervention of the parasitized children, educational workshops were implemented to prevent the return to the disease state and finally, the post-intervention control. In 2018, 72 preschoolers completed all stages of the program. In 2019, 62 did. In 2018 we registered 65.5% of parasitized children, detecting *Enterobius vermicularis*, *Giardia intestinalis* and *Blastocystis hominis.* In 2019 we registered a decrease in parasitized children (42.5%); being greater the impact in *E. vermicularis* and *G. intestinalis*. Regarding weight-height development, the variables low height for age, overweight and obesity showed better results after the intervention; but the same did not happen with a sedentary lifestyle. The strategies implemented have had good results with the general prevalence of parasites and weight-height development, but have been deficient with respect to changes in the sedentary lifestyle of children. Aspects that we must take into account to improve future interventions in the community.

Keywords:

Intestinal parasites and weight-height development. Therapeutic-educational intervention. Preschool children. Argentina

USO DEL GEN VH4-34 EN NEOPLASIAS B: DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA SU IDENTIFICACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Pablo Elías Morande, Alexia Vereertbrugghen, Ana Colado, Esteban Elias, Maricef Vergara Rubio, Valeria Sarapura Martínez, Mikele Amondarain, Raimundo Bezares, Horacio Fernández Grecco, Gregorio Cordini, Mercedes Borge, Romina Gamberale, Mirta Giordano

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (UBA - CONICET), Instituto de Medicina Experimental (CONICET - Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires)

INTRODUCCIÓN

La Leucemia de Células Vellosas (LCV) es una neoplasia de células B caracterizada por la presencia de pancitopenias, esplenomegalia e infiltración de células leucémicas en la médula ósea, bazo e hígado. Estas células B presentan un fenotipo maduro y circulan en sangre en bajo número. Su diagnóstico se basa en la detección de células leucémicas de apariencia "velluda" e inmunofenotipo de aspirado de medula ósea. Según ciertos antígenos expresados diferencialmente entre pacientes LCV, estos se agrupan en el perfil clásico de la enfermedad (LCVc) o variante (LCVv), de pronóstico negativo y refractariedad a terapias tradicionales (1).

El receptor de células B, o BCR por su sigla en inglés, es la inmunoglobulina (Ig) fijada a la superficie de las células B y es clave para entender el comportamiento del clon tumoral. El estudio *IGHV*, mediante el cual se identifican los genes de uso y la carga mutacional de la cadena pesada del *BCR* de un determinado paciente, provee información importante para predecir el curso clínico. Los pacientes con LCV que no presentan mutaciones en su IGHV respecto a la línea germinal manifiestan mayor carga tumoral y fallan frente al tratamiento con Cladribina en comparación a aquellos que presentan mutaciones (2). Por otra parte, los pacientes LCV que expresan el gen VH4-34 en el *BCR* de las células clonales cursan una enfermedad más agresiva que aquellos pacientes que no expresan este gen. Estudios realizados en pacientes LCV tratados con Cladribina mostró que los VH4-34^{+} son refractarios a esta terapia (3). Por ello, la identificación del gen VH4-34 obtenida al realizar el estudio *IGHV* es de importancia en la clínica de la LCV, independientemente del estado mutacional resultante del mismo estudio.

Nosotros contamos con el anticuerpo (Ac) 9G4 que permite identificar las células B normales que expresan el gen VH4-34. En este trabajo se evaluará el potencial uso del Ac 9G4 para identificar pacientes LCV VH4-34 $^{+}$ (4), y adicionalmente estudiaremos células tumorales derivadas de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) con el mismo fin.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre periférica de pacientes LCV de distintos centros de salud. Los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica recogidas sobre heparina. La sangre entera se diluyó a la mitad en solución fisiológica y se obtuvieron las CMSP mediante gradiente de Ficoll-Tryosom. Se extrajo RNA a partir de $5x10^6$ CMSP utilizando el reactivo TRIzol y siguiendo el protocolo correspondiente; para la síntesis de cDNA se empleó la enzima M-MLV y se evaluó la integridad del mismo mediante PCD para β-actina. Con el fin de identificar los genes de uso se realizó una PCR utilizando un mismo primer reverse, denominado JH, y 6 primers forward diferentes correspondientes a cada una de las familias de VH, denominados VH1-6. Además, en los casos donde no se pudo resolver a qué familia de VH correspondía el gen de uso, se utilizaron primers que amplificaban un fragmento mayor, llamados LH1-6. Para esto se utilizó la enzima GoTaq de Promega y se utilizó el Termociclador Ivema T18.

Para la electroforesis en gel de agarosa se prepararon geles de agarosa el 2% en buffer TAE (Tris, Acetato y EDTA) con bromuro de etidio para poder visualizar el ADN. Se sembraron las muestras junto con un marcador de peso molecular, un control negativo (agua) y un control positivo (utilizando un individuo con un VH conocido). Se visualizaron las bandas de ADN con un transiluminador UV. Luego se amplificaron específicamente las familias de VH expresadas, en un volumen final de 50µl, y se enviaron para ser secuenciadas en la empresa coreana Macrogen. Se solicitaron dos reacciones tanto para el primer forward como el reverse de cada muestra. Para el análisis de los resultados de secuenciación se alinearon las dos secuencias obtenidas utilizando la plataforma Clustal Omega MultipleSequenceAlignment Tool, y se utilizó la plataforma Ig-BLAST para determinar los genes V-D-J de uso y el porcentaje de mutaciones respecto a la línea germinal con la que hubo un mejor alineamiento. El criterio utilizado para considerar el gen VH mutado o no mutado es el siguiente: si la identidad es mayor a un 98% se consideró “no mutado” con respecto a la línea germinal y si es menor a dicho porcentaje se consideró “mutado”.

Las marcaciones citométricas se realizaron en células mononucleares totales (CMT) obtenidas a partir de gradiente de Ficoll-Triyosom. En cada caso, las células se incubaron por media hora en frío con el anticuerpo 9G4 a 1 µg/ml. Se utilizó como control de isotipo una concentración saturante de la IgG de rata monoclonal 2.4G2. Luego de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con solución salina suplementada con 1% de albúmina bovina e incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata marcado con FITC o violeta brillante, junto con los anticuerpos anti-CD19 o anti-CD3 según se describe en las figuras correspondientes. Las preparaciones celulares se analizaron usando los citómetros BD FACSCalibur y SysmexPartecCyflow-Space. Se utilizó el programa FlowJo para analizar los datos obtenidos.

RESULTADOS

Dado que se trata de una neoplasia rara, durante el transcurso de un año logramos recolectar muestras de 12 pacientes con LCV. Verificamos la presencia de células leucémicas en las muestras que recibimos mediante citometría de flujo, teniendo en cuenta el mayor tamaño de las células LCV, la expresión de CD19 y la expresión de una de las dos cadenas livianas de Ig, kappa o lambda, como se muestra en la Figura 1A del Anexo. Pudimos detectar células tumorales en 5 de las 12 muestras, sobre las que realizamos los posteriores estudios de PCR. Las características clínicas y el gen V de uso de la cohorte de pacientes se muestran en el panel B. Se pudieron identificar satisfactoriamente los genes V de uso del BCR de las 5 muestras procesadas (Fig C).

Como logramos identificar un paciente que expresaba el gen VH4-34 (LCV#1), decidimos desarrollar las marcaciones citométricas para evaluar si el Ac 9G4 es capaz de identificar a las células clonales. Desarrollamos dicha marcación también en pacientes con leucemia linfática crónica de células B (LLC), sobre los cuales también identificamos previamente los genes V de uso, discriminando pacientes positivos y negativos para el gen VH4-34 (Fig D).

Las células leucémicas del paciente LCV#1 (VH4-34+) unen en su totalidad el Ac 9G4. Sin embargo, las células de los pacientes VH4-34-, también mostraron un corrimiento indicativo de unión al 9G4 (Fig E). Esto no ocurre en muestras LLC, donde pudimos discernir mediante esta técnica citométrica fehacientemente entre pacientes VH4-34 positivos y negativos (Fig D). Pensamos que el aumento en la unión de Ac en los pacientes VH4-34 negativos puede deberse a las vellosidades características de estas células, que unirían los Acs de manera inespecífica, ya que también observamos un corrimiento cuando marcamos con el control de isotipo (2.4g2).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Debido principalmente a la pancitopenia característica en la LCV, solamente 5 de las 12 muestras que procesamos presentaron células leucémicas en la cantidad necesaria para poder desarrollar los experimentos propuestos. Al momento de desarrollar la PCR de las familias VH, nos encontramos con bandas atribuibles a las células B normales (policlonales). Sin embargo, al desarrollar el análisis de secuencia pudimos identificar exitosamente los genes VH de uso en las células B tumorales de estos 5 pacientes. Teniendo en cuenta las dificultades descriptas y la complejidad que implica identificar el gen VH de uso mediante de biología molecular, teniendo en cuenta el mal pronóstico asociado al uso del gen VH4-34 en la LCV consideramos que la identificación de este gen mediante citometría de flujo es relevante.

Cuando probamos el anticuerpo 9G4, observamos un corrimiento indicativo de positividad en el paciente VH4-34^{+}. Sin embargo, también observamos un corrimiento significativo en pacientes VH4-34^{-}, a diferencia de la especificidad lograda en pacientes con LLC. Es nuestro objetivo en los próximos meses recolectar más muestras y llevar a cabo variantes del protocolo citométrico para disminuir el pegado inespecífico que observamos en la LCV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Troussard X, Cornet E. Hairy cell leukemia 2018: Update on diagnosis, risk-stratification, and treatment. Am J Hematol. 2017;92(12):1382-90.

2. Forconi F, Cencini E, Sicuranza A, Sozzi E, Lauria F. Molecular insight into the biology and clinical course of hairy cell leukemia utilizing immunoglobulin gene analysis. Leuk Lymphoma. 2011;52(1):15-23.

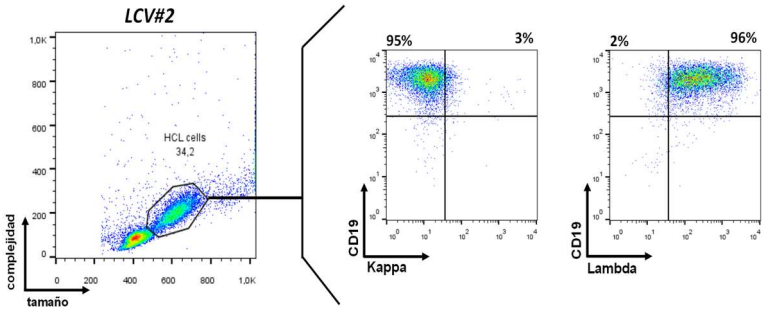
3. Arons E, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. Blood. 2009;114(21):4687-95.

4. Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ, Villano ME, Ryan DH, Insel RA, et al. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. J Clin Invest. 2001;108(7):1061-70.

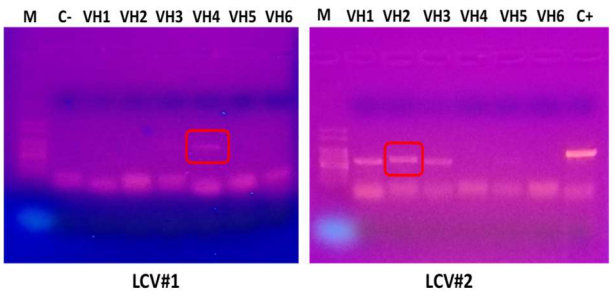
5. Kreitman RJ. Hairy cell leukemia: present and future directions. Leuk Lymphoma. 2019;60(12):2869-79.

FIGURA 1

A



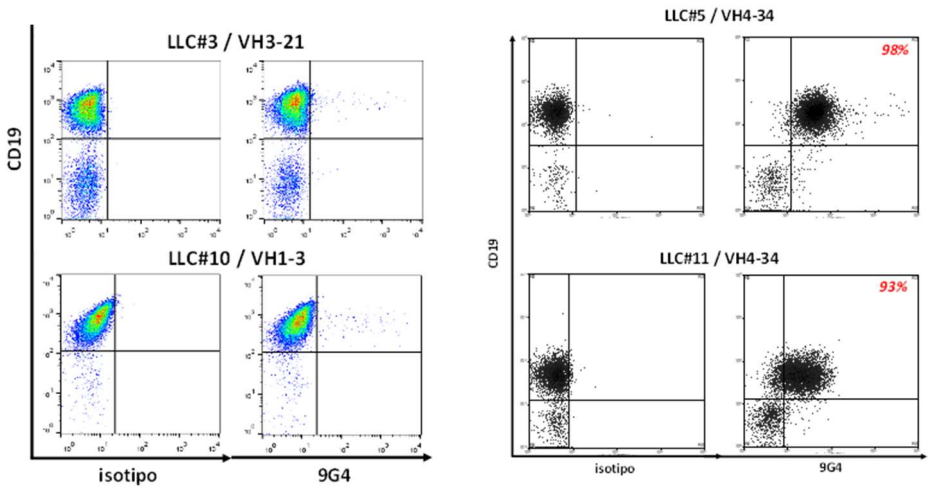
B



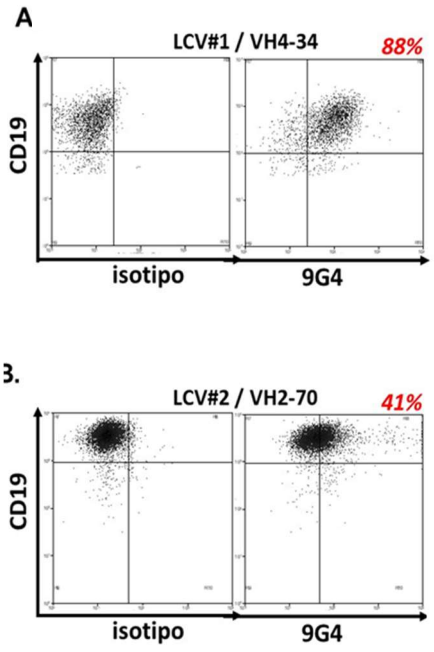
C

ID	Sexo	Edad	LCVc /LCVv	GBC (/µl)	Hc (%)	Plaquetas (/µl)	% LCV en CMSP	Gen VH de uso
LCV #1	M	88	Clásica	3840	22	8000	15.1	IGHV4-34
LCV #2	M	58	Variante	1570	22	21000	34.2	IGHV2-70
LCV #3	M	S.I.	Clásica	3040	45	71000	13,6	IGHV3-30
LCV #8	M	61	Clásica	2500	35	53000	28,4	IGHV5-51
LCV #9	M	32	Clásica	3800	42	85000	24,3	IGHV3-30

D



E



A. Las CMSP de pacientes con LCV fueron obtenidas mediante gradiente de Ficoll y estudiadas por citometría de flujo realizando una marcación con anti-CD19, anti-cadena liviana Kappa y anti-cadena liviana Lambda. Se seleccionaron las células leucémicas del gráfico de tamaño versus granularidad (en la izquierda de la figura) para luego evaluar la positividad para los marcadores seleccionados (a la derecha de la figura). En el ejemplo representativo mostrado, el paciente LCV#2 muestra 34% de células tumorales en sangre periférica, y su clon expresa la cadena liviana Lamdba en su Ig neoplásica.

B. Fotos representativas de los geles de agarosa de la PCR de VH para los pacientes LCV#1 (VH4-34) y LCV#2 (VH2-70), todas las bandas observadas se escindieron y se enviaron a secuenciar.

C. Se resumen los datos clínicos así como el uso de genes VH para pacientes LCV incluidos en este estudio. LCVc/LCVv: Leucemia de células vellosas clásica o variante; GBC: Glóbulos Blancos en circulación; Hc: Hematocrito; LCV en CMSP: Células leucémicas circulantes en células mononucleares de sangre periférica; S.I.: sin información.

D. Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLC fueron incubadas con el Ac 9G4, o con control de isotipo. Luego de los lavados, se incubó con anti-rata FITC y anti-CD19 PC5.5 para discriminar las células B. Finalmente se analizó en el citómetro de flujo. A partir del gráfico de tamaño versus complejidad granular se seleccionaron las células LLC, sobre los cuales se desarrolló el análisis posterior. En la izquierda se muestran los gráficos de puntos de expresión de CD19 y unión de 9G4 de los pacientes LLC#3 y #10, que expresan el gen VH1-3 en su Ig tumoral. A la derecha se muestran los gráficos de puntos de expresión de CD19 y unión al 9G4 de los pacientes LLC#5 y #11, que expresan el gen VH4-34 en su Ig tumoral según el estudio molecular de su secuencia.

E. Se realizó la marcación descripta para LLC en células mononucleares de pacientes LCV. En la parte superior se muestra el gráfico de puntos de expresión de CD19 y unión al 9G4 del paciente LCV#1, que expresa el gen VH4-34 en su Ig tumoral según el estudio molecular de su secuencia. En la parte inferior se muestra el gráfico de puntos de expresión de CD19 y unión al 9G4 del paciente LCV#2, que expresa el gen VH2-70 en su Ig tumoral.

ABSTRACT

Use of the VH4-34 gene in B cell neoplasms: development of a protocol to detect its expression by flow cytometry

Hairy cell leukemia (HCL) is a lymphoproliferative B cell malignancy of low incidence in which the clonal cell population displays a “hairy” appearance. HCL patients exhibit pancytopenia, splenomegaly and infiltration of HCL cells in the bone marrow, spleen and liver. The mutational status of the IGHV gene in the tumor immunoglobulin (Ig) is an important analysis in HLC, due to its potential as a prognosis indicator. It is usually performed through molecular biology techniques and, additionally, allows the identification of the genes used by the clonal Ig. HCL patients that expresses the VH4-34 gene represent a sub-group with a bad prognosis that shows refractoriness to standard treatment. In this study, we tested the suitability of the antibody 9G4 (specific for VH4-34) as a tool for the identification of VH4-34^{+} HCL patients by flow cytometry. We developed the IGHV analysis by molecular biology and were able to identify the gene usage for 5 HCL patients. Nevertheless, given the low number of circulating HCL cells, we were unable to accurately establish the mutational state of the clonal Ig. We were able to identify a VH4-34^{+} patient, and when we tested the 9G4 antibody for cytometry, we could detect a clear positivity for in 9G4 binding to HCL cells. However, we also noted a certain labeling of 9G4, albeit lower than in the VH4-34^{+} patient, in VH4-34 negative patients as well as certain positivity when incubated with the isotype control. We believe that this unspecific labeling can be due to the villi of the HCL cells, because when we developed this same protocol on cells obtained from chronic lymphatic leukemia patients, whose leukemic clone don’t show villi, we could clearly discriminate VH4-34^{+} patients from VH4-34^{-} ones. Our future goal is to improve this cytometric protocol in HCL developing variations to diminish unspecific binding.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS ONICOMICOSIS POR DERMATOFITOS Y NO DERMATOFITOS EN UN ÁREA DE ALTA PREVALENCIA

Javier Esteban Mussin

Instituto de Medicina Regional - Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

El término onicomicosis (OM) se utiliza para referirse a las infecciones de las uñas ocasionadas por hongos levaduriformes o filamentosos. Se estima que afectan al 5-20% de la población mundial. La variación en la tasa de OM en diferentes áreas geográficas se correlaciona con varios factores, como la situación inmunológica, predisposición genética, estilo de vida, comportamientos higiénicos y condiciones socioeconómico ambientales locales, género, edad, trabajo, historial de contacto con animales y/o suelos contaminados, exposición a áreas comunales húmedas (por ejemplo, piscinas, gimnasios), actividades deportivas, enfermedades comórbidas, traumatismos repetidos en las uñas, circulación periférica deficiente, coexistencia con tiña del pie y de la mano, entre otros.
Los dermatofitos son la causa más frecuente de OM, se las denomina *tinea unguium* y existen diferentes formas clínicas: distal y lateral subungueal, proximal profunda, blanca superficial, invasión endonix, distrofia ungueal total y onicolisis. Pero otros hongos filamentosos no dermatofitos, tales como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sarocladium* spp., también pueden causar esta patología considerados como agentes etiológicos oportunistas. Estas infecciones oportunistas tienen características clínicas similares a otras alteraciones ungueales producidas por los dermatofitos pero las opciones terapéuticas son muy pocas y su respuesta a los tratamientos es muy baja. Por otro lado, los hongos del género *Candida* producen lesiones en las uñas donde puede observase inflamación periungueal dolorosa (paroniquia o perionixis), así como onicolisis o también como colonizante en otro tipo de lesiones.

El diagnóstico micológico es imprescindible, requiere de un estricto procedimiento y es mandato para el diagnóstico diferencial con otras afecciones de origen no infeccioso, como la psoriasis, las onicodistrofias traumáticas o vasculares, el liquen, etc.

Las OM son, a veces, subestimadas pero si bien no ponen en peligro la vida del paciente pueden perjudicar su calidad de vida por molestias o dolores.

La prevalencia de OM en el nordeste argentino es alta, la respuesta a los tratamientos comunes es baja y se ha detectado una alta prevalencia de agentes poco frecuentes con mala respuesta a la terapia.

El objetivo de este proyecto fue caracterizar la epidemiología de las infecciones fúngicas ungueales en un área de alta prevalencia conociendo los agentes infecciosos más frecuentes y sus relaciones con las diferentes formas clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo y prospectivo. Se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de onicomicosis de manos y pies entre el 2010 y 2019 inclusive (periodo 10 años) al Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste.

Los datos se obtuvieron de la ficha epidemiológica del área de micología del Instituto de Medicina Regional donde se asientan desde el 2010 todos los datos y antecedentes de los pacientes, incluyendo: edad, sexo, estado de salud personal, ocupación, nivel socioeconómico, nivel de educación, pasatiempos, fisiología subyacente o estado inmune, antecedentes de tratamientos, existencia de otras enfermedades y antecedentes familiares.

La clasificación de las lesiones y el procesamiento de las muestras se realizaron de acuerdo al protocolo estandarizado para OM del área de micología del Instituto de Medicina Regional.

Las lesiones fueron clasificadas de la siguiente manera: a) distal o lateral subungueal (DSU) cuando el ataque comienza por el borde libre o el borde lateral de la uña; b) blanca superficial (BS) cuando las lesiones se presentan como manchas blancas en la cara externa de la uña; c) proximal profunda (PP) cuando la lesión se localiza en la región proximal pero abarca las capas ungueales más profundas; d) distrofia ungueal total (DUT) cuando se observa la destrucción completa de la tabla ungueal; e) onicolisis (OL) corresponde al despegamiento de la uña del lecho subungueal; f) paroniquia (PQ) cuando se observa la inflamación del reborde de la uña; g) formas combinadas (FC), que correspondieron a aquellas uñas donde se observa más de una lesión de las antes mencionadas, y h) otras lesiones cuando el aspecto de la uña no corresponda a ninguna de las anteriores formas clínicas y presenta alteraciones como cambio de color, estrías, onicosquicia, trauma, etc. Los exámenes microscópicos directos se realizaron con hidróxido de potasio al 40% con tinta azul negro permanente (Quink de Parker). Los cultivos se realizan en medios de agar lactrimel de Borelli, agar sabouraud dextrosa y agar papa glucosado, todos con cloranfenicol (250mg/l), con y sin cicloheximida (un total de 6 cultivos por muestra). Se incubaron a 28°C durante 3 semanas. Los hongos filamentosos se identificaron por sus características macro y micromorfológicas, mientras que las levaduras se tipifican mediante desarrollo en agar cromogénico, por las características micromorfológicas en agar harina de maíz con Tween 80 y sistema API ID 32C.

Las OM por dermatofitos se consideraron a aquellas que desarrollaron cultivos positivos para estos microorganismos con o sin examen microscópico directo (observación de presencia de hifas). Se consideraron OM por hongos filamentosos no dermatofitos (HFND) cuando se aisló la misma especie fúngica en 2 muestreos diferentes con examen directo positivo.

Se realizó análisis estadístico de los datos mediante el software estadístico InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diversidad de formas clínicas de las OM y el hecho de que muchas veces son indistinguibles de otras patologías ungueales, o bien, que pueden combinarse con las mismas, genera la importancia de conocer la epidemiología de estas infecciones para orientar a la comunidad médica en el manejo de las mismas. Asimismo, conocer los agentes etiológicos prevalentes permite tener una herramienta para demostrar a la comunidad médica la importancia de pedir el examen micológico y evitar tratamientos

largos, inadecuados, costosos, con efectos colaterales y sin respuesta. Las uñas pueden ser afectadas por hongos de distintos géneros y especies que responden de manera diferente a cada tipo de antimicótico.

En la **tabla 1** y **tabla 2** se muestran los resultados obtenidos. Se evidenció que las lesiones DSU son las más frecuentes en ambos sexos, tanto en uñas de manos como de pies. Por otro lado, los agentes etiológicos de onicomicosis mas frecuentes en uñas de mano pertenecen al grupo de las levaduras, siendo *Candida* spp. el principal agente causante. Mientras que el grupo de dermatofitos fue principal grupo causante de onicomicosis de uñas de pies siendo *T. rubrum* el agente etiológico mas frecuente.

Tabla 1. Formas clínicas de las lesiones ungueales según localización y sexo.

Forma clínica	**Uña de mano**		**Uña de pie**	
	M (%)	**F (%)**	**M (%)**	**F (%)**
DSU	38	32	56	58
BS	4	3	2	2
PP	2	3	1	1
DUT	10	7	11	9
PQ	5	10	1	1
OL	16	23	4	3
DSU + OL	15	14	19	18
FC	10	8	6	8

Tabla 2. Agentes etiológicos de onicomicosis según localización y sexo.

Grupo	**Agente**	**Uña de mano**		**Uña de pie**	
		M (%)	**F (%)**	**M (%)**	**F (%)**
Dermatofitos	*T. rubrum*	15	12	75	72
	T. mentagrophytes	7	5	7	10
	T. tonsurans	1	1	6	4
HFND	*Fusarium* spp.	1	2	3	5
	Acremonium spp.	1	-	2	2
	Aspergillus spp.	2	1	4	3
	Scopulariopsis spp.	-	-	1	2
Levaduras	*Candida* spp.	67	74	1	1
	Trichosporon spp.	6	5	1	1

CONCLUSIONES

Este estudio nos permitió conocer la prevalencia de las onicomicosis en el Chaco, los agentes etiológicos más frecuentes en relación con el sexo y las principales formas clínicas. En la actualidad estas afecciones son consideradas causa de disturbios emocionales y sociales. Ocuparse de su problemática, con un conocimiento real de su epidemiología, permite instaurar programas educativos para la comunidad, pero también, información para un mejor manejo por parte de la comunidad de salud. Los resultados

obtenidos representan un importante aporte en nuestra región para la micología médica, la dermatología, la infectología y la pediatría.

RESUMEN

Las onicomicosis representan aproximadamente el 50% de las onicopatías y pueden ser causadas por dermatofitos, levaduras u hongos filamentosos no dermatofitos. El objetivo de este proyecto fue caracterizar la epidemiología de las infecciones fúngicas ungueales en la provincia del Chaco conociendo los agentes infecciosos más frecuentes y sus relaciones con las diferentes formas clínicas. Se evidenció que las lesiones distales/laterales subungueales son las más frecuentes en ambos sexos, tanto en uñas de manos como de pies. Por otro lado, los agentes etiológicos de onicomicosis más frecuentes en uñas de mano pertenecen al grupo de las levaduras, siendo *Candida* spp. el principal agente causante. Mientras que el grupo de dermatofitos fue el principal grupo causante de onicomicosis de uñas de pies siendo *Trichophyton rubrum* el agente etiológico más frecuente. Este estudio nos permitió conocer la prevalencia de las onicomicosis en el Chaco, los agentes etiológicos más frecuentes en relación con el sexo y las principales formas clínicas.

ABSTRACT

Onychomycoses account for about 50% of onychopathies and can be caused by dermatophytes, yeasts or non-dermatophytic filamentous fungi. The aim of this project was to characterise the epidemiology of fungal infections of the nails in the Chaco and to know the most common pathogens and their relationships with the different clinical forms. It was found that distal/lateral subungual lesions are the most common in both sexes, both finger and toe nails. On the other hand, the most common etiological agents of onychomycosis of the fingernails belong to the yeast group, *Candida* spp. being the most important agent. In onychomycosis of the toenails, the dermatophyte group was the most important group, with *Trichophyton rubrum* being the most common pathogen. This study allowed us to determine the prevalence of onychomycosis in the Chaco, the most common pathogens by sex and the main clinical forms.

BIBLIOGRAFÍA

- **Perfil de sensibilidad antifúngica *in vitro* de *Scopulariopsis brevicaulis* aislados de onicomicosis.** Alfonso Javier Carrillo-Muñoz, Cristina Tur-Tur, Délia Cárdenes, Florencia Rojas, Gustavo Giusiano. *Revista Española de Quimioterapia*. 2015; 28(4):210-213.
- ***In vitro* activity of amphotericin B, terbinafine and azole drugs against clinical and environmental isolates of *Aspergillus terreus* sensu stricto.** MS. Fernandez, Florencia D. Rojas, MECattana, MA Sosa, CA. Iovannitti, Cornelia Lass-Flörl, GE. Giusiano. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2015; 59(6): 3619-3622.
- ***Aspergillus terreus complex*: an emergent opportunistic agent of onychomycosis.** Mariana S. Fernandez, Florencia D. Rojas, Maria E. Cattana, Maria de los Angeles

Sosa, Magdalena L. Mangiaterra, and Gustavo E. Giusiano. *Mycoses*. 2013; 56(4):477-481.

- **Influencia del grupo ecológico sobre la sensibilidad *in vitro* de los hongos dermatofitos a los antifúngicos.** Alfonso Javier Carrillo-Muñoz, Cristina Tur-Tur, Delia Cárdenes, Florencia Rojas y Gustavo Giusiano. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013; 30 (2):130–133.
- **Sertaconazole antifungal profile determined by a microdilution method versus nine topical substances against dermatophyte fungi.** Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Cárdenes D, Rojas F, Giusiano G. Chemotherapy. 2012; 58(5): 399-404.
- **Onicomicosis: estudio clínico, epidemiológico y micológico multicéntrico.** Silvia Relloso, Alicia Arechavala, Liliana Guelfand, Ivana Maldonado, Laura Walker, Iris Agorio, Soledad Reyes, Gustavo Giusiano, Florencia Rojas, Viviana Flores, Paula Capece, Gladys Posse, Federico Nicola, Silvia Tutzer, Mario Bianchi. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2012; 29 (3):157–163.
- **Actividad *in vitro* de terbinafina frente a *Aspergillus terreus* complex aislados como agente de onicomicosis.** Fernández M, Rojas F, Cattana M, Sosa MA, Iovannitti C, G Giusiano. XIII Congreso Argentino de Micología. XXIII Jornadas Argentinas de Micología. 2014.

EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA TIPO 1 EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: UN ESTUDIO EXPLORATORIO EN LA BASE DE DATOS PPMI

Santiago Pérez Lloret, Lucas Udovin, Matilde Otero-Losada, Sofia Bordet, Guenson Chevalier, Cecilia Quarracino, Francisco Capani

Universidad Abierta Interamericana - Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. UAI-CAECIHS. CONICET

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más importante después del Alzheimer [1]. Los muchos avances en la fisiopatología de la EP no han producido tratamientos preventivos o retardadores de la progresión. El sistema renina-angiotensina (RAS) en el cerebro se informó en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica y la supervivencia neuronal. Los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II (ARA) y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) previnieron el daño neuronal causado por neurotoxinas dopaminérgicas en modelos experimentales celulares y animales de EP [2]. Además, perindopril, un IECA, redujo la latencia de la respuesta motora a L-DOPA y aumentó los períodos de en los cuales se registra un efecto significativo de los medicamentos antiparkinsonianos (periodos “ON”) durante el día de vigilia en un pequeño estudio doble ciego, aleatorizado, cruzado [3]. Analizamos los datos del estudio Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) y evaluamos los efectos potenciales de los ARA y los IECA en la progresión de la enfermedad en pacientes con EP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Participantes del estudio.

Este estudio incluyó a 423 pacientes con EP recién diagnosticados y no tratados del estudio PPMI [4]. Los criterios de inclusión fueron: 1) una historia de EP de 2 años, 2) una etapa I o II de Hoehn y Yahr en el momento de la inscripción, 3) un déficit de proteína transportadora de dopamina medido por tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), 4) ninguna expectativa clínica de comenzar la medicación con EP hasta seis meses después de la evaluación inicial.

Los Comités de Revisión Institucional en los sitios clínicos participantes aprobaron el protocolo del estudio PPMI. Antes de ser incluidos en el estudio, todos los participantes firmaron un consentimiento informado por escrito mediante el cual el resultado se compartiría con investigadores involucrados y no involucrados, de manera ciega.

Diseño del estudio.

Este estudio comprendió dos subestudios: un estudio de casos y controles y un estudio de cohortes.

Para el primer subestudio, los casos se definieron como pacientes con EP que requerían L-DOPA dentro del primer año después del diagnóstico, a diferencia de los controles que no lo hicieron. La fecha índice fue la fecha de la primera prescripción de L-DOPA para los casos o la visita más cercana en los controles. Se consideró la exposición a ARA (valsartán, telmisartán, losartán, candesartán, irbesartán, olmesartán, eprosartán, azilsartán, filmasartán, tasosartán) o a un ACEis (hidrófilo: captopril, enalapril, imidapril, lisinopril; lipofílico: benazepril, cilazapril, fosinopril, delapril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, trandolapril, zofenopril) cuando el medicamento había sido recetado durante al menos 2 años antes de ingresar al estudio. Las dosis de los medicamentos se registraron y se convirtieron en dosis diarias definidas (DDD) [5].

El resultado principal del subestudio de cohorte fue el cambio en la puntuación total de los SMD-UPDRS (es decir, la suma de las partes I a IV) durante los primeros cinco años después de la inclusión. También se analizaron las subpuntuaciones de las partes I a IV. El examen motor (es decir, la Parte III) se evaluó en la condición prácticamente definida, sin medicación. Se consideró que un paciente estaba expuesto a los ARA o IECA si estaba recibiendo estos medicamentos en una y todas las visitas anteriores y durante dos años antes de la visita inicial. Por ejemplo, la exposición en la visita de Año 1 significaba que un paciente había estado tomando estos medicamentos durante al menos 2 años al inicio del estudio y durante todo el año posterior. La exposición en la visita del Año 2 significaba que el paciente había estado tomando estos medicamentos durante al menos 2 años al inicio del estudio y durante los dos años posteriores, y así sucesivamente para la exposición en los Años 3, 4 y 5. Entonces, el estado de un paciente podría cambiar de "expuesto" a "no expuesto" durante el seguimiento, pero no al revés.

Análisis estadístico.

Para el estudio de casos y controles, las pruebas de chi-cuadrado o t exploraron las diferencias en la exposición al fármaco. Análisis multivariados con regresión logística ajustada por edad y sexo, gravedad de la enfermedad en el momento de la inclusión (probada por la puntuación MDS-UPDRS II+III), puntuación de comorbilidad Elixhauser, que refleja efectos inespecíficos sobre la salud general de los pacientes [6], y presencia de comorbilidades cardiometabólicas. El valor d de Cohen, estimación del efecto de tamaño, se calculó como la diferencia entre medias dividida por la desviación estándar agrupada (DE) [7].

La evolución de los sujetos expuestos o no a ACEis o ARB durante los cinco años de seguimiento se comparó utilizando Ecuaciones de Estimación General (GEE). El sexo, la edad, el tiempo desde el diagnóstico hasta la visita inicial, la presencia de comorbilidades cardiometabólicas y el uso de medicamentos antiparkinsonianos fueron tratados como factores de confusión. Las comparaciones post-hoc de medias marginales, calculadas por el modelo GEE, se realizaron en cada punto temporal. El nivel de significancia se estableció convencionalmente en 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS v.23 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

RESULTADOS

Subestudio de casos y controles.

De los 423 sujetos incluidos en el estudio, 103 (24%) iniciaron el tratamiento con L-DOPA (casos) durante el año 1 de seguimiento, mientras que 320 pacientes (76%) no lo hicieron (controles). La mediana de tiempo para comenzar con L-DOPA fue de 6 meses (rango intercuartílico, IQR = 5-8 meses). Los casos eran mayores que los controles, tenían una enfermedad de inicio tardío con una puntuación de Hoehn y Yahr más alta al inicio del estudio (Tabla 1). En el mes 12, 273 de los 423 pacientes (64%) tomaban al menos un fármaco antiparkinsoniano, 110/273 (40%) pacientes tratados con más de 1 fármaco al mismo tiempo. Cinco (1%) pacientes recibieron anticolinérgicos, 34 (8%) recibieron amantadina, 103 (24%) recibieron L-DOPA, 119 (28%) recibieron agonistas dopaminérgicos y 135 (32%) recibieron inhibidores de la MAO-B. La dosis diaria de L-DOPA fue de 438,1±274,8 mg.

En esta muestra, 29 (6,9%), 12 (2,8%) y 12 (2,8%) pacientes fueron expuestos a IECA hidrófilos, IECA lipofílicos y ARA, respectivamente, al inicio del estudio (Tabla 1). Los fármacos más consumidos fueron: lisinopril para los IECA hidrófilos (21/29 = 72%), ramipril para los IECA lipofílicos (5/12 = 41%) y valsartán para los ARA (4/12 = 33%). La Tabla 1 muestra las características y la exposición a drogas de interés en casos y controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la exposición. Sin embargo, los casos expuestos a ARA mostraron una tendencia a un menor riesgo de requerir L-DOPA en comparación con los controles (OR ajustado: 0,26; IC intervalo de confianza del 95%: 0,03-2,18, Tabla 1) con un valor d de Cohen medio-alto de 0,74. Estos valores se mantuvieron sin cambios cuando las puntuaciones de Hoehn y Yahr se consideraron como un factor de confusión o cuando se consideraron las comorbilidades cardiometabólicas en lugar de la puntuación de Elixhauser.

Subestudio de cohortes.

De los 423 sujetos incluidos en el estudio, 344 (81%) estaban disponibles en el Año 1, 331 (79%) en el Año 2, 329 (78%) en el Año 3, 310 (73%) en el Año 4 y 298 (70%) en el Año 5. De los 125 pacientes desaparecidos en el Año 5, 91 pacientes fueron interrumpidos del estudio (73%), mientras que el resto de los pacientes no habían alcanzado la visita de quinto año en el momento del análisis.

El número acumulado de pacientes expuestos a IECA hidrofílica al inicio y a los años 1, 2, 3, 4 y 5 fueron 29 (8%), 27 (8%), 26 (8%), 19 (6%) y 19 (6%) respectivamente. La exposición acumulada a ACEis lipofílicos fue de 11 (3%), 10 (3%), 10 (3%), 8 (3%) y 8 (3%), respectivamente. Finalmente, la exposición acumulada a los ARA fue de 9 (3%), 8 (3%), 7 (3%), 7 (3%) y 7 (3%), respectivamente. Las puntuaciones medias ± desviaciones estándar de los MDS-UPDRS en estas visitas fueron 32,3±13,1 al inicio y 39,1±16,2, 43,1±17,4, 46,1±19,0, 51,0±21,7 y 51,5±22,1 en los Años 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. El GEE reveló una asociación significativa entre la puntuación total de SMD-UPDRS y la exposición a los ARA (OR ajustado: 0,85; IC intervalo de confianza del 95%: 0,76-0,95; $p<0,01$, Tabla 2).

La puntuación total de MDS-UPDRS durante el seguimiento en pacientes, expuestos o no a los ARA, se muestra en la Figura 1. No se observaron asociaciones significativas con la exposición a IECA hidrófilos (0,91, 0,81-1,01; p = 0,08) o IECA lipofílicos (1,04, 0,91-1,20; p = 0,56). Como se muestra en la Tabla 2, los pacientes expuestos a ARA o IECA hidrófilos mostraron subpuntuaciones MDS-UPDRS III estadísticamente significativas (evaluadas en el estado OFF prácticamente definido). Un análisis estratificado por edad, que es un factor de confusión importante, mostró que la exposición a los ARA se relacionó con valores totales más bajos de MDS-UPDRS en todas las categorías de edad (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Si bien el control sintomático de los síntomas motores de la EP se puede lograr mediante el uso de una variedad de medicamentos o dispositivos [8], los tratamientos modificadores de la enfermedad aún no están disponibles. La "Resignificación de fármacos", es decir, la práctica de utilizar medicamentos antiguos y conocidos para nuevas indicaciones, puede ofrecer la oportunidad de desarrollar tratamientos modificadores de la EP de forma rápida y rentable. También tiene la ventaja de identificar señales de efectos relevantes en modelos experimentales y estudios observacionales para su posterior traducción en ensayos clínicos. Exploramos los efectos clínicos de los ARA y los IECA, que han mostrado efectos sintomáticos y neuroprotectores en modelos experimentales de EP de la enfermedad [2] y han reducido el riesgo de EP en un estudio de cohorte basado en la población con pacientes hipertensos [9]. Nuestros resultados sugieren que los pacientes con EP expuestos a ARA tuvieron una puntuación total de MDS-UPDRS comparativamente más baja y subpuntuaciones de la Parte III (examen neurológico) durante los primeros cinco años de seguimiento después del diagnóstico. El cambio en el riesgo de requerir L-DOPA durante el primer año de seguimiento no alcanzó una diferencia estadística en estos pacientes en comparación con los controles no expuestos. Estas observaciones son compatibles con un posible efecto sintomático o modificador de la enfermedad de los ARA. Los pacientes expuestos a IECA hidrosolubles también mostraron una reducción estadísticamente significativa en la subpuntuación de la Parte III. Los IECA liposolubles no mostraron efectos. El mecanismo de acción de los ARA y los IECA en la EP no está claro, y explicar la diferencia en los efectos de estos fármacos observados aquí es difícil. El receptor AT1 puede activarse en ausencia de Ang II [10]. Por lo tanto, los ARA pueden tener un mayor efecto, ya que estabilizan el receptor AT1 y bloquean su activación incluso en ausencia de Ang II.

Una ventaja de este estudio es haber utilizado dos enfoques complementarios para aumentar la posibilidad de detectar una señal de eficacia. El primer enfoque fue un estudio de casos y controles utilizando el requisito de L-DOPA durante el primer año de seguimiento como resultado. Este resultado se ha utilizado con frecuencia en el contexto de los estudios de futilidad de fase II de prueba de concepto [10]. Las principales limitaciones de este resultado pueden ser que está influenciado por factores socioculturales y económicos (es decir, situación laboral y sistema público de salud), así como por diferencias en las actitudes de los médicos hacia el tratamiento temprano de los pacientes con EP. Utilizamos el mismo conjunto de datos para constituir una cohorte de pacientes con EP seguidos hasta 5 años después del diagnóstico de EP [4]. A medida que avanza el PPMI, no todos los pacientes alcanzaron el final de este período, lo que nos obligó a utilizar técnicas estadísticas que pudieran tener en cuenta los datos censurados

(es decir, la técnica GEE). El resultado de este subestudio fue la progresión de las puntuaciones totales de los MDS-UPDRS. Aunque las puntuaciones MDS-UPDRS se han utilizado en algunos ensayos recientes de modificación de la enfermedad en la EP (NCT02168842), es posible que no sean medidas confiables del proceso subyacente de la enfermedad una vez que se ha recibido tratamiento sintomático. Además, el estado prácticamente definido puede ser una medida poco fiable de la progresión de la enfermedad, ya que la respuesta de "larga duración" puede ser difícil de excluir. Por lo tanto, ninguno de los resultados puede ser confiable cuando se los considera de manera individual, pero considerarlos juntos podría aumentar la validez de las señales de eficacia del fármaco.

Otro punto positivo es haber aplicado una definición conservadora de exposición a los ARA o IECA. El tratamiento durante al menos dos años antes del diagnóstico de EP y la ausencia de interrupciones durante los cinco años de seguimiento posteriores al diagnóstico fueron requisitos para considerar a un paciente como expuesto a cada uno de estos medicamentos. La técnica GEE nos permitió manejar los datos faltantes y los cambios en el estado de exposición, sin excluir al paciente de los análisis. El uso de una definición menos conservadora de exposición habría producido más pacientes expuestos, a costa de perder confiabilidad.

Este estudio posee ciertas limitaciones. El pequeño número de pacientes expuestos a los fármacos en estudio puede haber ocultado la significación estadística de las diferencias entre los grupos. Por esta y otras razones, realizamos el subestudio de cohortes. La combinación de múltiples observaciones de pacientes individuales permitió caracterizar y excluir la variabilidad dentro de los sujetos, aumentando así el poder estadístico. No obstante, el análisis de los resultados de los dos subestudios en conjunto aumentó el error alfa experimental. No corregimos esto para evitar una mayor reducción del poder estadístico.

CONCLUSIÓN

Observamos una señal de posibles efectos clínicos de los ARA que merece mayor atención en futuros ensayos clínicos. Los ARA se utilizan comúnmente en pacientes con EP para tratar la hipertensión. Entonces, los estudios de Fase I pueden no ser necesarios, y un ensayo de prueba de concepto de futilidad [10] parece justificado. El resultado de nuestro estudio puede sentar las bases para el diseño correspondiente.

REFERENCIAS

[1] E.R. Dorsey, R. Constantinescu, J.P. Thompson, K.M. Biglan, R.G. Holloway, K. Kieburtz, F.J. Marshall, B.M. Ravina, G. Schifitto, A. Siderowf, C.M. Tanner, Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, Neurology 68(5) (2007) 384-6.

[2] S. Perez-Lloret, M. Otero-Losada, J.E. Toblli, F. Capani, Renin-angiotensin system as a potential target for new therapeutic approaches in Parkinson's disease, Expert opinion on investigational drugs 26(10) (2017) 1163-1173.

[3] K.A. Reardon, F.A. Mendelsohn, S.Y. Chai, M.K. Horne, The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease, Australian and New Zealand journal of medicine 30(1) (2000) 48-53.

[4] I. Parkinson Progression Marker, The Parkinson Progression Marker Initiative (PPMI), Prog Neurobiol 95(4) (2011) 629-35.

[5] WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2012, World Health Organization, Oslo, 2011.

[6] Y. Fortin, J.A. Crispo, D. Cohen, D.S. McNair, D.R. Mattison, D. Krewski, External validation and comparison of two variants of the Elixhauser comorbidity measures for all-cause mortality, PloS one 12(3) (2017) e0174379.

[7] J. Cohen, Statistical power analysis for the behavioral sciences, 2nd ed., L. Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J., 1988.

[8] S.H. Fox, R. Katzenschlager, S.Y. Lim, B. Barton, R.M.A. de Bie, K. Seppi, M. Coelho, C. Sampaio, C. Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine, International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease, Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 33(8) (2018) 1248-1266.

[9] Y.C. Lee, C.H. Lin, R.M. Wu, J.W. Lin, C.H. Chang, M.S. Lai, Antihypertensive agents and risk of Parkinson's disease: a nationwide cohort study, PloS one 9(6) (2014) e98961.

[10] Parkinson Study Group, A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme Q10 in early Parkinson disease: no evidence of benefit, JAMA Neurol 71(5) (2014) 543-52.

ABSTRACT

Introduction. We explored the potential clinical effects of angiotensin-II AT1 receptor blockers (ARBs) and angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) in patients from the Parkinson’s Progress Marker Initiative (PPMI) study database.

Methods. We included 423 newly diagnosed PD patients, free from antiparkinsonian treatment, from the PPMI. We compared the proportion of patients starting on L-DOPA during the first year of follow-up, and the changes in MDS-UPDRS total score and sub-scores during the first five follow-up years for patients exposed or not to ARBs or ACEIs.

Results. Treatment with ARBs did not affect the proportion of patients on L-DOPA during the first year (adjusted OR, 95% CI= 0.26, 0.03-2.18, N.S.) while reduced MDS-UPDRS total score (0.85, 0.76-0.95, $p<0.01$). Patients treated with ACEIs experienced no changes in either measure.

Conclusions. These results show potential signals for a beneficial effect with ARBs. Further clinical trials are warranted.

Tabla 1 Características de los pacientes que iniciaron con L-DOPA durante el primer año de seguimiento o no.

	Muestra de DP (n=423)	Controles (n=320)	Casos (n=103)	valor p	Efecto tamaño (d de Cohen)
Características de los pacientes					
Machos	277 (65%)	211 (66%)	66 (64%)	0.73	-
Edad (años)	61,7±9,7	60,6±9,6	65.1±9.4	<0,01	-
Edad de la EP en el momento del diagnóstico	61.1±9.7	60.1±9.6	64,5±9,3	<0,01	-
Duración de la enfermedad (meses)	6.7±8.4	6.7±8.6	6.6±7.7	0.94	-
Antecedentes familiares de EP	103 (24%)	84 (26%)	19 (18%)	0.10	-
Puntuación de comorbilidad de Elixhauser	0.6±2.8	0.6±2.8	0,6±2,9	0.95	-
Comorbilidades cardiometabólicas					
Hipertensión	136 (32%)	102 (32%)	34 (33%)	0.89	-
Diabetes	21 (5%)	16 (5%)	5 (5%)	0.93	-
Hipercolesterolemia	88 (21%)	65 (20%)	23 (22%)	0.70	-
Síndrome metabólico	1 (<1%)	0	1 (1%)	0.80	-
Puntuación de Hoehn y Yahr					
Yo	185 (44%)	157 (49%)	28 (27%)	<0,01	
Ii	236 (56%)	160 (51%)	76 (73%)		
Puntuaciones MDS-UPDRS II+III al inicio del estudio	34.9±14.6	34.5±14.2	36.4±15.9	0.32	-
Exposición a drogas					
ACEis hidrófilos	29 (6.9%)	20 (6.3%)	9 (8.7%)	0.38	0.21
Duración (años)	8.9±7.0	10.6±7.7	7.2±3.0	0.22	0.01
DDD (mg)	1.8±1.3	1.6±1.3	2.4±1.2	0.21	0.12
ACEis lipofílicos	12 (2.8%)	8 (2.5%)	4 (3.9%)	0.46	0.04
Duración (años)	9.9±8.9	7.5±4.3	14.3±14.3	0.41	0.02
DDD (mg)	2.9±2.1	4.9±3.4	2.1±0.8	0.10	0.05
Arb	12 (2.8%)	10 (3.1%)	2 (1.9%)	0.52	0.74
Duración (años)	6.7±3.2	7.1±3.1	8.5±3.1	0.57	0.11
DDD (mg)	1.5±0.5	1.4±0.7	1.5±0.7	0.84	0.52

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE) (variables continuas) o frecuencia y porcentaje (variables categóricas). Las comparaciones bivariadas se realizaron mediante una prueba t o una prueba de Chi-cuadrado. EP: enfermedad de Parkinson; MDS-UPDRS: Movement Disorders Society-Unified Parkinson's Disease

Rating Scale; IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA: Antagonistas de los Receptores Tipo 1 de Angiotensina II.

Tabla 2. Efectos de los ARA y los IECA sobre la evolución de la puntuación total y las subpuntuaciones de los MDS-UPDRS durante los primeros cinco años después del diagnóstico de EP.

Puntajes MDS-UPDRS	Arb	IECA lipofílica	IECA hidrófilos
Total	0,85, 0,76-0,95 (pág<0,01)	1,04, 0,91-1,20 (p=0,56)	0,91, 0,81-1,01 (p=0,08)
Primera parte	0,64, 0,29-1,43 (p=0,28)	1,61, 0,26-10,1 (p=0,61)	0,76, 0,39-1,51 (p=0,44)
Parte II	0,86, 0,70-1,07 (p=0,17)	1,16, 0,92-1,48 (p=0,21)	0,91, 0,77-1,07 (p=0,25)
Parte III (fuera del estado)	0,87, 0,77-0,98 (p=0,02)	1,01, 0,86-1,17 (p=0,96)	0,89, 0,80-0,99 (p=0,04)
Parte IV*	0,68, 0,26-1,79 (p=0,43)	0,84, 0,31-2,28 (p=0,74)	0,90, 0,46-1,72 (p=0,75)

Se muestran los odds ratio, sus intervalos de confianza del 95% y (valores de p). Los efectos del fármaco se evaluaron mediante GEE, ajustando el tiempo desde el diagnóstico en la visita inicial, la edad, el sexo, el uso de tratamientos antiparkinsonianos y la presencia de comorbilidades cardiometabólicas.

* Esta variable se clasificó como puntuación = 0 (Referencia) vs puntuación ≥ 1 para ajustarse a un modelo GEE significativo.

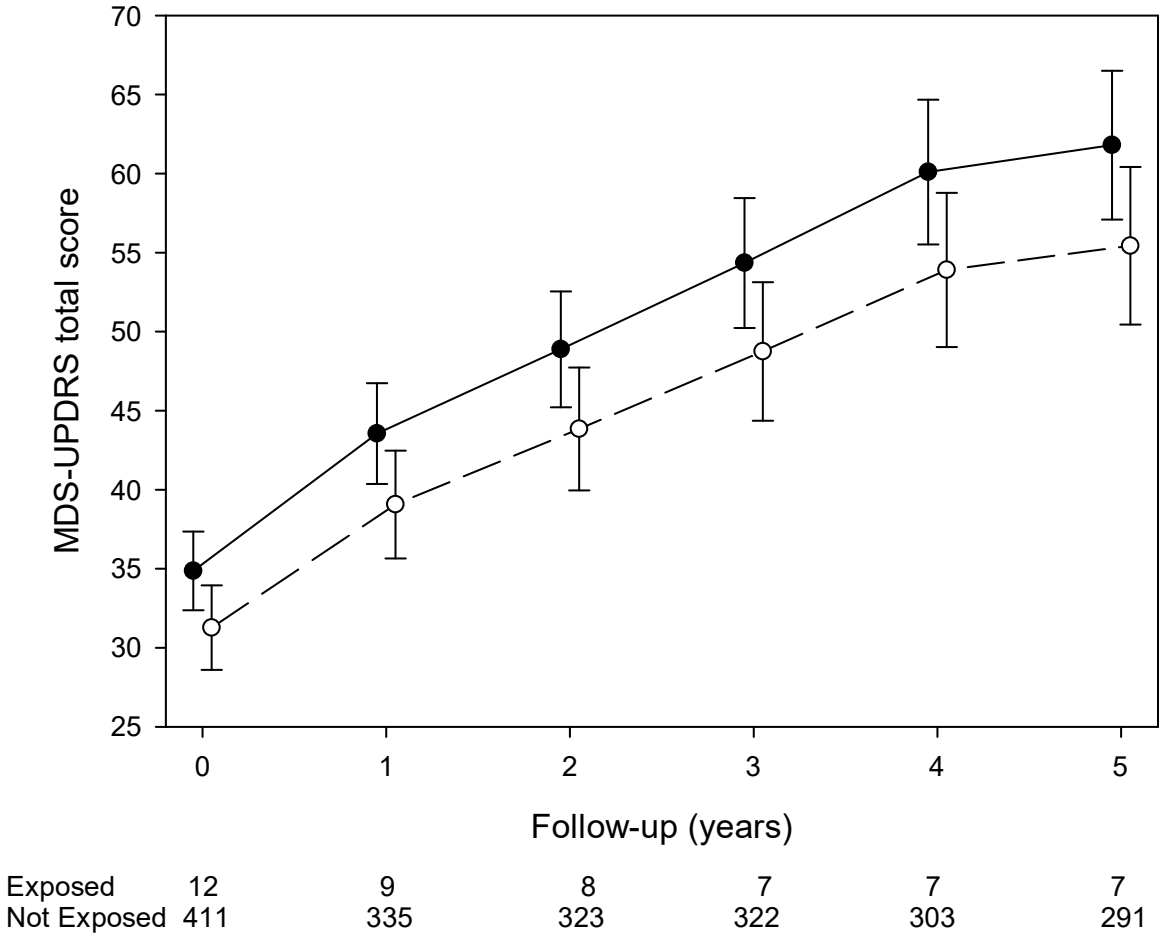


Figura 1. Puntuación total de MDS-UPDRS en pacientes expuestos (○) o no (●) a los antagonistas de los receptores Tipo 1 de Angiotensina II. Se muestran las medias marginales estimadas y los errores estándar, ajustados por el tiempo desde el diagnóstico en la visita inicial, la edad, el sexo, el uso de tratamientos antiparkinsonianos y la presencia de comorbilidades cardiometabólicas.

MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DURANTE LA INFECCION DE RHODNIUS PROLIXUS CON TRIPANOSOMÁTIDOS: COMO DETENER UNA ENFERMEDAD CONOCIENDO SU TRANSMISIÓN

Agustín Rolandelli[1], Adeisa E. C. Nascimento[2], Leticia S. Silva[2], Rolando Rivera-Pomar[1], Alessandra A. Guarneri[2]

[1]Centro de Bioinvestigaciones (CeBio), Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (CIT-NOBA), UNNOBA - CONICET. [2] Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, Instituto René Rachou, Brazil

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma rangeli es el tripanosomátido de América del Sur que más comúnmente infecta a los humanos después de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas[1]. Aunque las infecciones humanas por *T. rangeli* son frecuentes, se considera no patogénico para el vertebrado, pero sí para sus vectores, las vinchucas del género *Rhodnius*. La distribución geográfica de *T. rangeli* se superpone a la de *T. cruzi*, ya que ambos parásitos infectan a los mismos mamíferos y vectores, siendo las co-infecciones extremadamente frecuentes. Por lo tanto, la transmisión de *T. rangeli* por los vectores de *T. cruzi* es biológica y epidemiológicamente importante debido a las reacciones serológicas cruzadas, que dificultan el correcto diagnóstico e identificación del agente causal de la infección. Es por esto que los estudios de *T. rangeli* se enmarcan dentro de la epidemiología de la enfermedad de Chagas[2]. Asimismo, *T. rangeli* ha surgido como un modelo de estudios biológicos y moleculares relacionados con las interacciones parásito-vector-hospedador, dado que el conocimiento generado ayuda a entender la dinámica de la transmisión vectorial y las bases químicas y moleculares de la patogénesis tanto de este parásito como de *T. cruzi*, pudiendo conducir a la identificación de blancos terapéuticos y al desarrollo de drogas o de vacunas para el tratamiento del mal de Chagas[3].

La interacción *R. prolixus*-*T. rangeli* comienza cuando los parásitos son ingeridos por la vinchuca durante la alimentación sobre un hospedador infectado. Luego de la ingesta, *T. rangeli* se diferencia en el tracto digestivo y eventualmente invade la hemolinfa hasta alcanzar las glándulas salivares, para continuar con su ciclo de transmisión a un nuevo hospedador durante la próxima alimentación[3,4]. De este modo, para establecer la infección, *T. rangeli* debe superar las barreras impuestas por el sistema inmune en el tracto digestivo y en la hemolinfa de *R. prolixus*. Así, el sistema inmune de la vinchuca es uno de los factores críticos que determinan la capacidad intrínseca del insecto para infectarse con el parásito, permitir su multiplicación y, posteriormente, la transmisión a un huésped susceptible (competencia vectorial)[5].

A pesar de carecer de inmunidad adaptativa, los insectos montan una fuerte respuesta inmune innata frente a la infección por microorganismos. Estos son reconocidos como extraños por receptores de reconocimientos de patrones (PRRs), que interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y disparan principalmente tres vías del sistema inmune: IMD, Toll y Jak/STAT. Estas vías de señalización poseen factores de transcripción (*relish*, *dorsal* y *STAT*, respectivamente) y reguladores negativos (*caspar*, *cactus* y *PIAS*, respectivamente) específicos, que al activarse llevan a la expresión diferencial de genes con efectos antimicrobianos, principalmente por células epiteliales y/o del cuerpo graso[6,7]. Sin embargo, en comparación a otras enfermedades parasitarias transmitidas por vectores, se conoce muy poco sobre las interacciones moleculares entre *T. rangeli* y los triatominos[8]. Esto se debe a que, por un lado, el sistema inmune de los Hemípteros ha sido menos estudiado en relación a insectos de órdenes superiores y, por el otro, a que la respuesta inmune de insectos frente a infecciones parasitarias ha sido menos investigada que las infecciones con otros microorganismos[9,10].Hasta el momento, se desconocen las vías del sistema inmune que se activan en *R. prolixus* durante la infección con *T. rangeli*, y si existe relación en la actividad de estas vías con la carga parasitaria presente en diferentes regiones del cuerpo del vector.

En este trabajo, analizamos la carga parasitaria en intestino y hemolinfa de *R. prolixus* con diferentes formas de infección con *T. rangeli*. Además, evaluamos la expresión de factores de transcripción (*Rp-Relish*, *Rp-Dorsal* and *Rp-STAT*) e inhibidores (*Rp-Cactu*s and *Rp-Caspar*) de las vías IMD, Toll y Jak/STAT en el cuerpo graso del vector. Finalmente, determinamos posibles asociaciones entre la activación de las vías del sistema inmune con el número de parásitos presente en las vinchucas, mediante análisis de correlación. Nuestra hipótesis es que la infección de *R. prolixus* con *T. rangeli* en el tracto digestivo y/o hemolinfa desencadena distintas vías del sistema inmune, que impactan diferencialmente en el número de parásitos que sobreviven en ambas regiones del cuerpo de la vinchuca. El objetico general de este proyecto es identificar blancos en el vector que puedan ser modulados para el control de la transmisión de infecciones parasitarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron para todos los experimentos ninfas de 4toestadío de *R. prolixus*, de 30 días de edad y sin alimentación previa, provenientes de la colonia de insectos del Centro de Pesquisas René Rochou (Fiocruz, Minas, Brasil). Los insectos fueron mantenidos a una temperatura de 26 ± 1 ºC, humedad relativa de 65 ± 10% y ciclos de iluminación natral.

La cepa de *T rangeli* utilizada fue la COACHI, aislada originalmente de *R. prolixus* infectados naturalmente[11]. Los epimastigotes utilizados para las inoculaciones fueron obtenidos de cultivos de 10 días en medio LIT, con el agregado de 15% de suero bovino fetal, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Posteriormente, fueron resuspendidos en PBS a una concentración de $5x10^4$ parasitos/ml[12]. Para las infecciones orales se utilizaron ratones (cepa SwissWebster) con 14 días de infección (pico de parasitemia), infectados por medio de picadura de vinchucas infectadas.

Para simular la infección natural con *T. rangeli*, las ninfas de *R. prolixus* fueron separadas aleatoriamente en dos grupos, y se les permitió la alimentación con aproximadamente 20 µl de sangre sobre ratones anestesiados (Ketamina -150 mg/kg- y Xilazina -10 mg/kg-): un grupo se alimentó en ratones sanos y otro grupo en ratones infectados con *T. rangeli*.

La presencia de parásitos en el tracto digestivo se comprobó 10 días luego de la alimentación, en 10 insectos por grupo. El tracto digestivo de los mismos fue disecado, homogeneizado y diluido en PBS (dilución 1/5) para evaluar la presencia de parásitos por microscopia. La totalidad de insectos analizados que fueron alimentados con ratones infectados presentaron parásitos en el tracto digestivo, mientras que no se encontraron parásitos en ninguno de los insectos alimentados en ratones sanos.

Posteriormente, el día 7 después de la ingesta de sangre, ambos grupos de insectos fue dividido en dos al azar, y se utilizó una jeringa Hamiltong de 50 µl para inyectar 1 µl de PBS + LIT o 1 µl de inóculo del parásito en la hemolinfa de cada grupo, en la inserción de la pata del tercer segmento torácico. La inoculación se realizó dado que *T. rangeli* no siempre invade el hemocele del insecto[13]. La presencia de parásitos en la hemolinfa se comprobó 10 días luego de la inoculación, en 20 insectos por grupo. Para tal fin, se cortó el segmento más terminal de una de las patas del tercer segmento torácico del insecto, se extrajo del corte 2 µl de hemolinfa mediante presión abdominal y se evaluó la presencia de parásitos por microscopia. La totalidad de insectos analizados que fueron inoculados con *T. rangeli* presentaron parásitos en la hemolinfa, mientras que no se hallaron parásitos en ninguno de los insectos inoculados con PBS + LIT.

De esta forma, se obtuvieron cinco grupos de insectos (con parásitos en intestinos y/o en hemolinfa), simulando las diferentes etapas de infección: (1) alimentados con ratones sanos e inoculados con PBS + LIT (insectos controles sin infección, grupo **G-H-**), (2) alimentados con ratones infectados con *T. rangeli* e inoculados en hemolinfa con el parásito (insectos con infección intestinal y en hemolinfa, grupo **G+H+**), (3) alimentados con ratones sanos pero inoculados con *T. rangeli* (insectos sólo con infección en hemolinfa, grupo **G-H+**), (4) alimentados con ratones infectados e inoculados con PBS + LIT, sin infección en hemolinfa (insectos sólo con infección intestinal, grupo **G+H-**) y (5) alimentados con ratones infectados e inoculados con PBS + LIT, pero con infección en hemolinfa debido a infección espontanea del hemocele (insectos con infección intestinal y natural en hemolinfa, grupo **G+H+Nat**). Dos semanas luego de la inoculación, se permitió la alimentación de todos los grupos de insectos sobre ratones sanos. Finalmente, una semana después (cuatro semanas desde el inicio del experimento) se realizaron los recuentos de parásitos y las extracciones de ARN de cuerpo graso en insectos individuales de todos los grupos. Cada experimento se repitió 3 veces (réplicas biológicas), y las muestras de insectos utilizadas provinieron de las tres réplicas, con excepción del grupo G+H+Nat cuyos ejemplares aparecieron en dos de las réplicas.

La carga parasitaria en la hemolinfa se determinó obteniendo 2 µl de la misma por corte del segmento final de la tercera pata derecha de cada insecto. Luego se la diluyó en 18 µl de solución anticoagulante y se empleó 5 µl de la dilución para estimar el número de parásitos por conteo directo en Cámara de Neubauer[14]. Para evaluar la carga parasitaria en el tracto digestivo primero si disecó el tracto digestivo completo (anterior, posterior, recto) de cada insecto, se lo lavó tres veces en PBS, y se homogeneizó en 20 µl de PBS. Se utilizó 5 µl del homogenato para estimar el número de parásitos por conteo directo en Cámara de Neubauer.

Luego de remover el tracto digestivo, se disecó el cuerpo graso de cada insecto y se lo transfirió inmediatamente a un tubo conteniendo 1,5 ml de TRizol. Se siguieron las instrucciones del fabricante para realizar las extracciones de ARN a partir de este tejido. El ARN obtenido se resuspendió en 20 µl de H_2O y se cuantificó mediante NanoDrop. La integridad del ARN se confirmó a través de la visualización del mismo en geles de agarosa teñidos con intercalantes fluorescentes. Posteriormente, se trató 1 µg de ARN con DNasa (TransGenBiotech, Beijing, China), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Finalmente, se realizó la síntesis de cDNA utilizando la transcriptasa reversa EasyScript (TransGenBiotech, Beijing, China), con 500 ng de RNA digerido y siguiendo las indicaciones del fabricante. El cDNA obtenido se diluyó al medio en H_2O estéril.

La expresión de los genes del sistema inmune se determinó mediante Real Time PCR (RT-qPCR), utilizando el dispositivo ABIPRISM 7500 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific). Se diseñaron pares de *primers* específicos para amplificar regiones de los genes *α-actin* (housekeeping), *Rp-Relish*, *Rp-Dorsal*, *Rp-Caspar* and *Rp-STAT*. El par de *primers* para *Rp-Cactus* fue obtenido de la literatura[15]. La eficiencia de reacción de cada par de *primers* se calculó mediante la pendiente de la regresión lineal obtenida de la amplificación de sucesivas diluciones seriadas. La identidad de cada amplicón fue confirmada mediante secuenciación por Sanger (Standard-Seq, Macrogen). Las secuencias, longitud de amplicón y eficiencia de cada par de *primers* se detallan en la **Tabla 1**. Todas las reacciones de RT-qPCR consistieron de 1 µl de cDNA, 0.3 µl de cada *primer* (10 mM), 5 µl de iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) y 3.4 µl de H_2Oen un volumen final de 10 µl. Las condiciones de ciclado fueron: 95 ºC por 5 min; 35 ciclos de: 95 ºC por 15s, 55 ºC por 30s y 72 ºC por 30s; seguido por un análisis de curvas de *melting*, para confirmar las especificidad de las reacciones. Se incluyeron en todas las corridas controles sin molde y controles no-RT, para verificar la ausencia de DNA exógeno, la formación de dímeros de *primers* y/o contaminaciones. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado. La expresión relativa de cada transcripto se calculó considerando la eficiencia de cada par de *primers* según el método de Pffafl, utilizando *α-actin* como referencia y normalizando la expresión de cada gen a la obtenida para el grupo control (grupo G-H-)[16].

Tabla 1. Secuencia nucleotídica, longitud del amplicón en pares de bases y eficiencia de reacción de RT-qPCR para cada par de *primers* utilizado en este estudio.

Gen	Secuencia del *primer* (5'→3')	Longitud del amplicón	Eficiencia de reacción de RT-qPCR
□*-actina*	Fw-GACTTGGCTGGTCGTGATCT	201p.b.	95,81%
	Rv-ACCATCAGGCAATTCGTAGG		
Rp-Relish	Fw-CCGCATGGACCATTAACTG	167p.b.	108,55%
	Rv-AGGTTCACTTCTTACACTTCTTC		
Rp-Caspar	Fw-GATGGTAGTGTATTGACGAATG	196p.b.	106,28%
	Rv-CGGTGACAGTGATCTTGC		
Rp-Dorsal	Fw-GTCATTGTTCTGGTTCAGTAGC	181p.b.	91,25%
	Rv-GGCGTTCGGAATGAAATAGC		
Rp-Cactus	Fw-GTGCTGGTGCTTGTACGAAA	154p.b.	96,84%
	Rv-GGAGTCGGACGATACCTCAA		
Rp-STAT	Fw-GGCACCGAATCAGTAATGG	173p.b.	94,17%
	Rv-AAAGCATTATCCCAGGTTACC		

Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism v6.0. Se utilizó el estadístico t de Student no pareado para la comparación entre dos grupos experimentales. Se aplicó ANOVA de un factor con el test *a posteriori* de Bonferroni para analizar diferencias entre tres o más grupos experimentales. El análisis de correlación se llevó a cabo usando el estadístico de Spearman. Valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La carga intestinal de *T. rangeli* es mayor cuando la hemolinfa de *R. prolixus* también está infectada.

Primero, investigamos si había diferencias entre la carga parasitaria en intestino y hemolinfa en *R. prolixus* infectados por distintas vías con *T. rangeli*. Para eso, como se detalla en "Materiales y Métodos", trabajamos con 5 grupos de insectos: (1) insectos controles sin infección (**G-H-**), (2) insectos con infección oral y en hemolinfa por inoculación (**G+H+**), (3) insectos sólo con infección en hemolinfa (**G-H+**), (4) insectos sólo con infección oral (**G+H-**) e (5) insectos con infección intestinal y natural en hemolinfa (**G+H+Nat**).

En los insectos que fueron infectados oralmente, pero que diferían respecto a la presencia de *T. rangeli* en hemolinfa, encontramos menor carga parasitaria intestinal en el grupo G+H- en comparación con los grupos G+H+ o G+H+Nat (**Fig 1A**, Media ± desvío = 25,607 ± 3,274 para G+H-; 58,704 ± 8,258 para G+H+ y 71,833 ± 8,552 para G+H+Nat, $p < 0.001$ para todas las comparaciones mencionadas). Por el contrario, cuando analizamos la carga de *T. rangeli* en la hemolinfa de insectos infectados en esta región hallamos números similares, independientemente de la infección intestinal (**Fig 1B**, Media ± desvío = 18,589 ± 2,550 para G-H+; 16,137 ± 1,726 para G+H+ y 15,692 ± 1,567 para G+H+Nat, $p > 0.05$). Estos resultados sugieren que la carga intestinal del parásito puede ser afectada por la presencia de *T. rangeli* en la hemolinfa. De hecho, observamos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el número de parásitos en intestino y en hemolinfa en insectos con infección en ambos sitios (G+H+ y G+H+Nat, **Fig 1C**, $r = 0.55$, $p < 0.001$), indicando mayor carga parasitaria en el intestino de *R. prolixus* cuando la carga de *T. rangeli* en hemolinfa es alta.

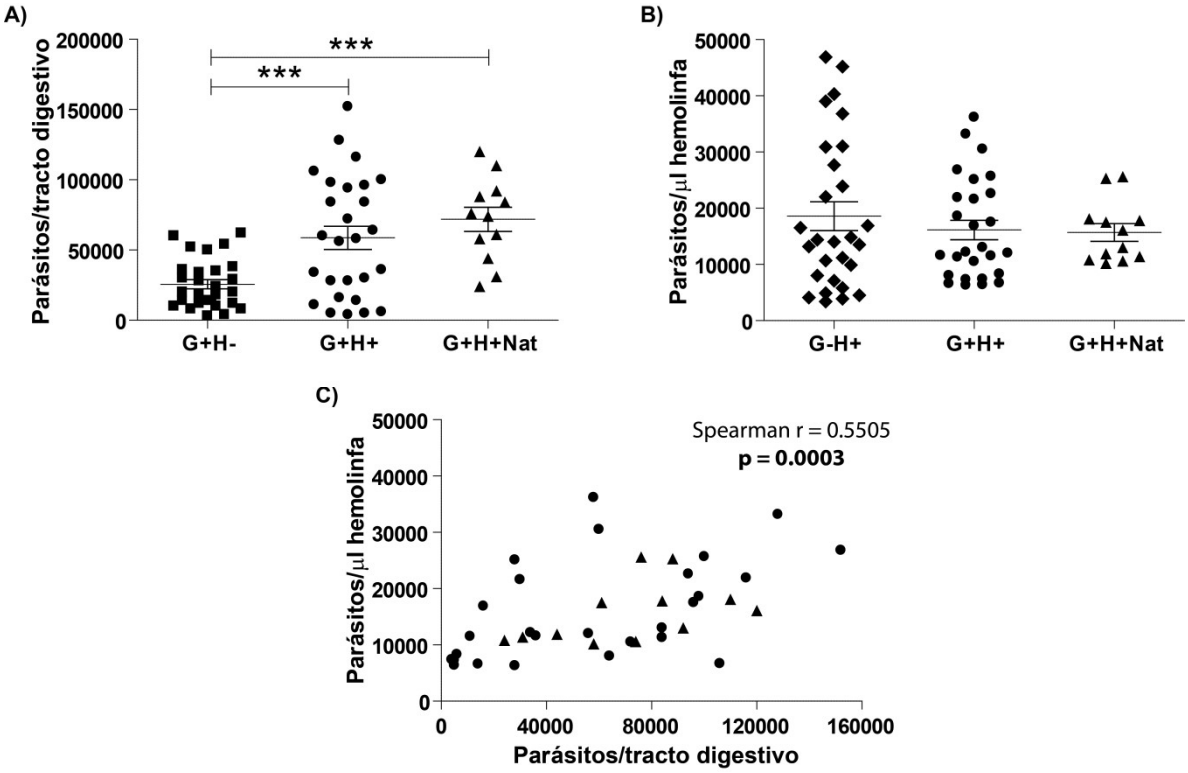


Figura 1. Carga parasitaria en el intestino y hemolinfa de *R. prolixus* infectado con *T. rangeli* por distintas vías. (A-B) Carga parasitaria en **(A)** intestino y **(B)** hemolinfa. Cada punto representa el número de parásitos encontrado analizando insectos individualmente. Las barras de error representan la media ± desvío. Asteriscos corresponden a diferencias significativas (*** p <0.001) obtenidas por ANOVA. **(C)** Correlación entre el número de *T. rangeli* encontrado en intestino y hemolinfa. Cada punto representa la carga parasitaria presente en el intestino y la hemolinfa de cada insecto analizado. G+H-: insectos sólo con infección oral (representados por cuadrados); G-H+: insectos sólo con infección en hemolinfa (representados por rombos); G+H+: insectos con infección oral y en hemolinfa por inoculación (representados por círculos); G+H+Nat: insectos con infección oral y natural en hemolinfa (representados por triángulos). Cada grupo experimental contiene muestras de insectos provenientes de tres replicas biológicas (n = 26-28), con 8-10 insectos analizados por réplica (con excepción del grupo G+H+Nat, compuesto de 12 insectos obtenidos de dos réplicas).

La infección en hemolinfa incrementa el número de parásitos en el intestino de *R. prolixus* infectado oralmente con *T. rangeli*.

Para generar más evidencias que avalen la hipótesis sobre la modulación del número de parásitos intestinales por la infección de *T. rangeli* en hemolinfa, seguimos el protocolo detallado en "Materiales y Métodos", pero primero inoculamos a los insectos en el hemocele con 50 o 500 parásitos (H+50 y H+500, respectivamente) o con PBS + LIT (H-50 y H-500) y dos semanas después realizamos las infecciones orales. Luego de una semana, evaluamos el número de parásitos en el intestino y la hemolinfa de los insectos. Encontramos mayor número de *T. rangeli* en el intestino de los grupos H+50 y H+500 en comparación con sus respectivos controles (**Fig 2A**, Media ± desvío = 14,125 ± 3,265 para H-50; 33,500 ± 3,859 para H+50; 18,250 ± 2,624 para H-500 y 36,625 ± 4,424 para H+500, p <0.01 para todas las comparaciones mencionadas). Asimismo, no evidenciamos diferencias en la carga parasitaria en intestino entre insectos que fueron inoculados en el

hemocele con distintas dosis de *T. rangeli* (**Fig 2A**, p >0.05 para H+50 *vs* H+500). Además, detectamos números similares del parásito en la hemolinfa de insectos que fueron inoculados con distintas dosis de *T. rangeli* (**Fig 2B**, Media ± desvío= 43,640 ± 2,937 para H+50 y 43,560 ± 2,072 para H+500, p >0.05). Estos resultados indican que la carga parasitaria alcanzada en la hemolinfa es similar independientemente de la dosis de inoculación, pero que la presencia de *T. rangeli* en la hemolinfa incrementa el número de parásitos en el intestino de *R. prolixus* con infección oral.

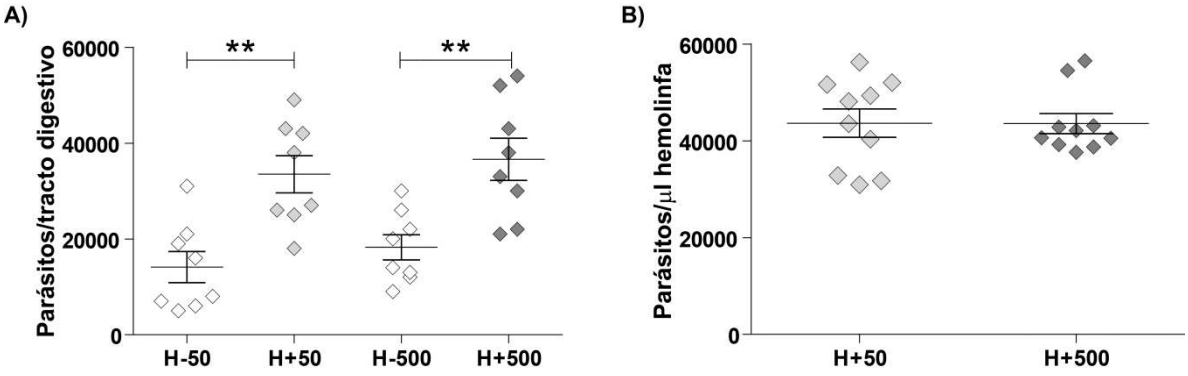


Figura 2.Carga parasitaria en intestino y hemolinfa de *R. prolixus* con infección sistémica y posterior infección oral con *T. rangeli*. Carga parasitaria en **(A)** intestino y **(B)** hemolinfa. Cada punto representa el número de parásitos encontrado analizando insectos individualmente. Las barras de error representan la media ± desvío. Asteriscos corresponden a diferencias significativas (** p<0.01) obtenidas por prueba de t no apareada. H+50: insectos inoculados en el hemocele con 50 parásitos; H+500: insectos inoculados en el hemocele con 500 parásitos; H-50 y H-500: grupos controles inoculados con PBS + LIT. Dos semanas luego de la inoculación, todos los grupos de insectos fueron infectados oralmente, y el recuento de parásitos se realizó una semana después. Cada grupo experimental contiene insectos provenientes de dos replicas biológicas (N = 8-10), con 4-5 insecto por réplica.

Modulación de las vías IMD, Toll y Jak/STAT del sistema inmune en *R. prolixus* infectado por distintas vías con *T. rangeli*.

Como la respuesta inmune del vector está directamente involucrada en reconocer y atacar al parásito durante las infecciones, y evadir esta respuesta es crítico en la capacidad del parásito para establecer la infección, decidimos investigar si había diferencias en la activación de las vías IMD, Toll y Jak/STAT del sistema inmune en el cuerpo graso de *R. prolixus* infectado por distintas vías con *T. rangeli* (**Fig 3**). Respecto a la vía IMD, encontramos una disminución en la expresión del factor de transcripción *Rp-Relish* en los grupos G+H-, G-H+ y G+H+Nat, en comparación con insectos controles (**Fig 3A**, Media ± desvío = 0.30 ± 0.08 para G+H-; 0.25 ± 0.14 para G-H+; 0.37 ± 0.14 para G+H+ y 0.29 ± 0.09 para G+H+Nat, p <0.05 para todas las comparaciones mencionadas), y niveles similares del inhibidor *Rp-Caspar* entre los distintos grupos experimentales (**Fig 3D**, Media ± desvío = 1.29 ± 0.29 para G+H-; 0.39 ± 0.12 para G-H+; 1.01 ± 0.30 para G+H+ y 0.82 ± 0.22 para G+H+Nat, p >0.05). Además, considerando la vía Toll, medimos una expresión similar del factor de transcripción *Rp-Dorsal* entre los diferentes grupos de insectos (**Fig 3B**, Media ± desvío= 0.52 ± 0.16 para G+H-, 0.35 ± 0.11 para G-H+, 0.72 ± 0.26 para G+H+ y 0.48 ± 0.13 para G+H+Nat, p >0.05). Sin embargo, evidenciamos mayores niveles del inhibidor *Rp-Cactus* en los insectos G+H- en comparación con los grupos G-H-, G+H+ y G+H+Nat (**Fig 3E**, Media ± desvío= 2.29 ± 0.43 para G+H-; 1.23

± 0.37 para G-H+; 0.79 ± 0.19 para G+H+ y 0.49 ± 0.09 para G+H+Nat, p <0.05 para G+H- *vs* G-H-, p <0.01 para G+H- *vs* G+H+ y p <0.001 para G+H- *vs* G+H+Nat). Asimismo, respecto a la vía Jak/STAT, hayamos una menor expresión del factor de transcripción *Rp-STAT* en los grupos G-H+, G+H+ y G+H+Nat, en comparación con insectos controles (**Fig 3C**, Media ± desvío = 0.42 ± 0.16 para G+H-; 0.24 ± 0.02 para G-H+; 0.40 ± 0.10 para G+H+ y 0.39 ± 0.10 para G+H+Nat; p <0.05 para G+H+ *vs* G-H- y p <0.01 para G-H+ *vs* G-H- y G+H+Nat *vs* G-H-). Así, nuestros resultados demuestran por primera vez que componentes claves en las vías IMD, Toll y Jak/STAT del sistema inmune de *R. prolixus* son modulados diferencialmente durante la infección oral y/o sistémica por *T. rangeli*.

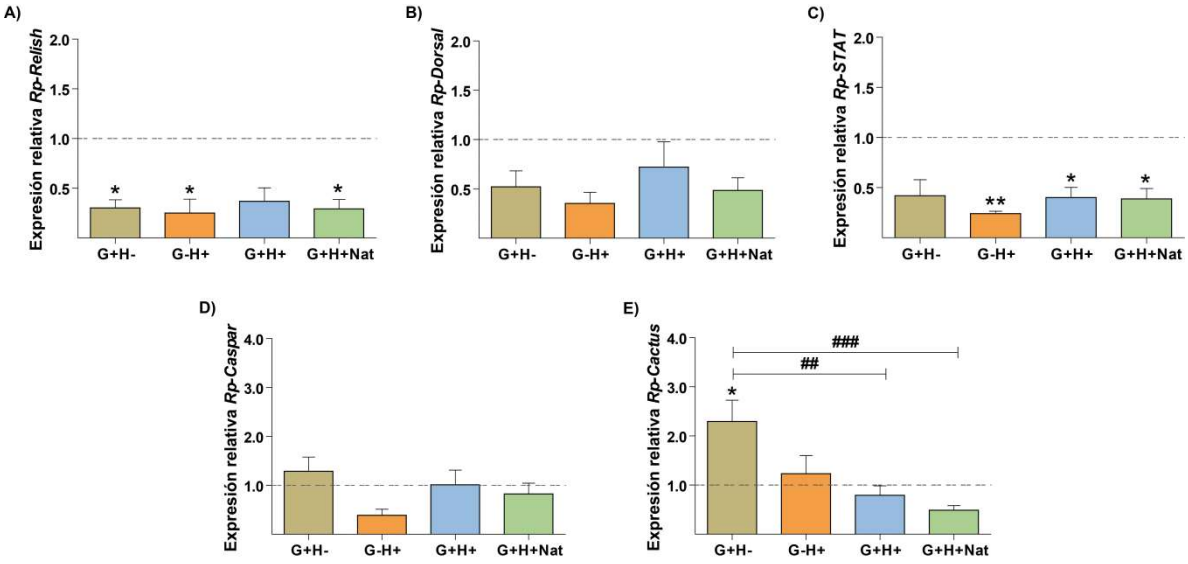


Figura 3. Expresión de genes de las vías IMD, Toll y Jak/STAT en el cuerpo graso de *R. prolixus* infectado por distintas vías con *T. rangeli.* Abundancia relativa de ARNm de los factores de transcripción **(A)** *Rp-Relish*, **(B)** *Rp-Dorsal* y **(C)** *Rp-STAT*, y de los inhibidores **(D)** *Rp-Caspar* y **(E)** *Rp-Cactus*. Los datos de qRT-PCR fueron analizadas con el método de Pfaffl, usando□*-Actina* como gen de referencia y normalizando a la expresión de insectos controles (representado por la línea de puntos). Las barras de error representan la media ± desvío. Asteriscos corresponden a diferencias significativas (* p<0.05 y ** p<0.01) en comparación con controles, y numerales corresponden a diferencias significativas ($^{\#\#}$ p<0.01 and $^{\#\#\#}$ p<0.001) entre los grupos experimentales seleccionados, obtenidas por ANOVA. G+H-: insectos sólo con infección oral; G-H+: insectos sólo con infección en hemolinfa; G+H+: insectos con infección oral y en hemolinfa por inoculación; G+H+Nat: insectos con infección oral y natural en hemolinfa. Cada grupo experimental contiene muestras de insectos provenientes de tres replicas biológicas (n = 8-10), con 2-4 insectos analizados por réplica (con excepción del grupo G+H+Nat, compuesto de insectos obtenidos de dos réplicas).

Correlación entre carga parasitaria y expresión de genes del sistema inmune en *R. prolixus* infectado con *T. rangeli.*

Finalmente, evaluamos si existe correlación entre la expresión de genes de las vías IMD, Toll and Jak/STAT y la carga parasitaria en intestino (**Fig 4**) o hemolinfa (**Fig 5**) en *R. prolixus* infectado con *T. rangeli*. No encontramos asociación entre la expresión de *Rp-Dorsal* (**Fig 4B**, r =0.05, p >0.05), *Rp-STAT* (**Fig 4C**, r =0.08, p >0.05) o *Rp-Caspar* (**Fig 4D**, r =0.08, p >0.05) y los números de parásitos hallados en intestino. Sin embargo,

detectamos una correlación negativa entre la carga parasitaria in intestino y la expresión del factor de transcripción *Rp-Relish* (**Fig 4A**, r =-0.61, p =0.001) y del inhibidor *Rp-Cactus* (**Fig 4E**, r =-0. 52, p <0.01). Asimismo, no encontramos asociación entre los números de *T. rangeli* medidos en hemolinfa y la expresión de *Rp-Dorsal* (**Fig 5B**, r =-0.26, p >0.05), *Rp-STAT* (**Fig 5C**, r =0.07, p >0.05), *Rp-Caspar* (**Fig 5D**, r =-0.11, p >0.05) o *Rp-Cactus* (**Fig 5E**, r =-0.11, p >0.05), pero evidenciamos una correlación negativa la carga parasitaria y la expresión del factor de transcripción *Rp-Relish* en esas muestras (**Fig 5A**, r =-0.51, p <0.01). En conjunto, nuestros resultados demuestran una relación entre el número de parásitos hallados en intestino y hemolinfa con la expresión de genes críticos para la regulación de la actividad de vías del sistema inmune en *R. prolixus* infectado con *T. rangeli*.

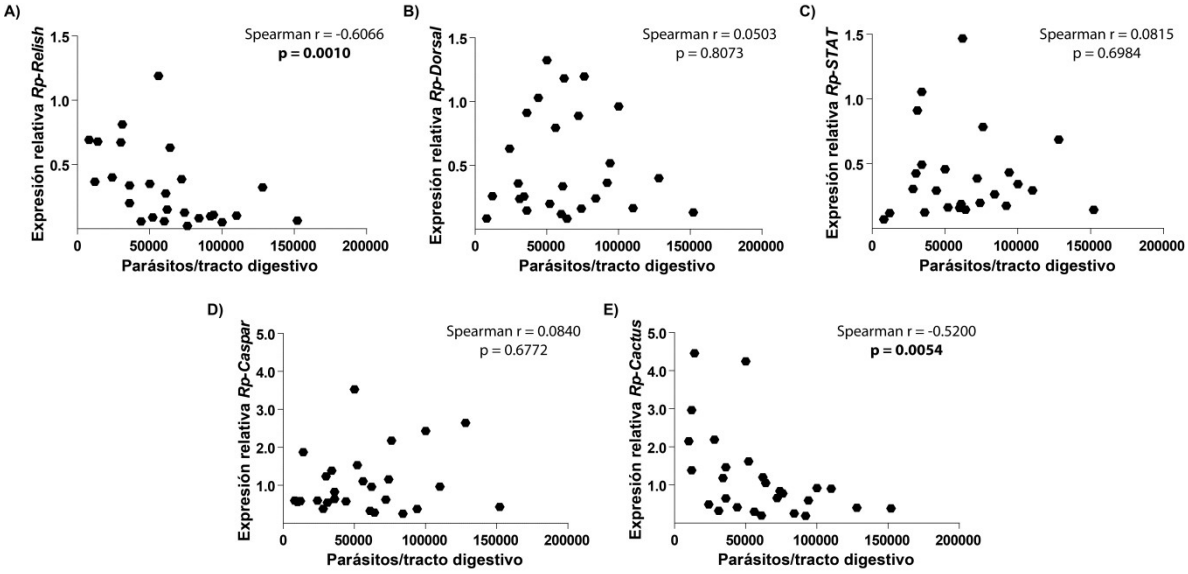


Figura 4. Correlación entre la carga parasitaria intestinal y la expresión de genes de las vías IMD, Toll y Jak/STAT en *R. prolixus* infectado por distintas vías con *T. rangeli*. Correlación entre el número de parásitos intestinales y la abundancia relativa de ARNm de los factores de transcripción **(A)** *Rp-Relish*, **(B)***Rp-Dorsal* y **(C)** *Rp-STAT*, y de los inhibidores **(D)** *Rp-Caspar* y **(E)** *Rp-Cactus*. Cada punto representa la expresión génica en cuerpo graso y el número de parásitos en intestino medidos en insectos individuales (n = 25-27), provenientes de tres réplicas biológicas.

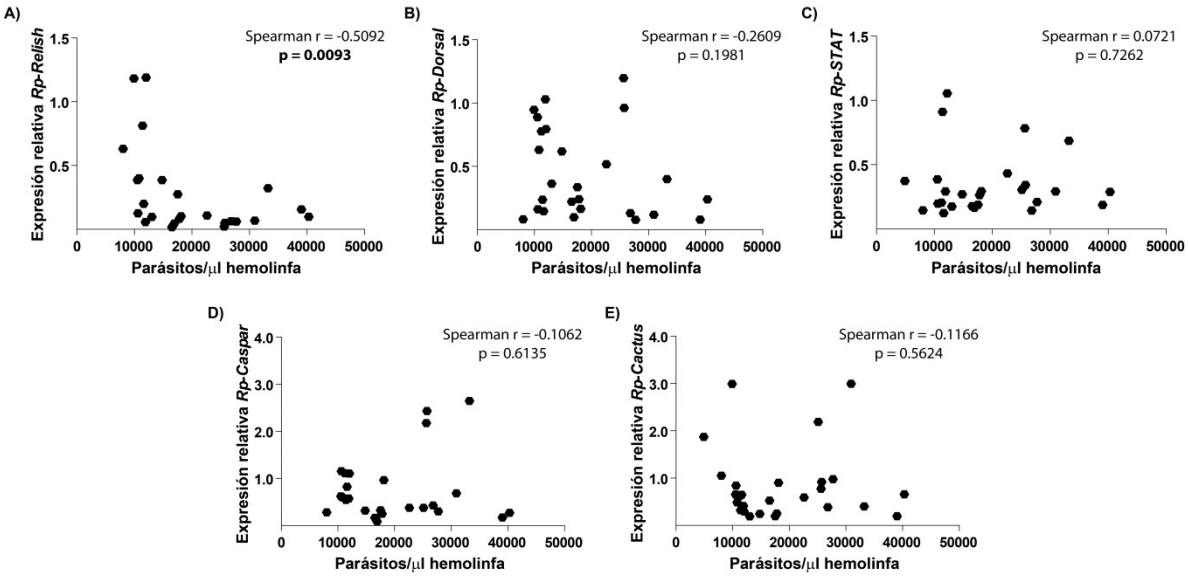


Figura 5. Correlación entre la carga parasitaria en hemolinfa y la expresión de genes de las vías IMD, Toll y Jak/STAT en *R. prolixus* infectado por distintas vías con *T. rangeli.* Correlación entre el número de parásitos en hemolinfa y la abundancia relativa de ARNm de los factores de transcripción **(A)** *Rp-Relish*, **(B)** *Rp-Dorsal* y **(C)** *Rp-STAT*, y de los inhibidores **(D)** *Rp-Caspar* y **(E)** *Rp-Cactus*. Cada punto representa la expresión génica en cuerpo graso y el número de parásitos en hemolinfa medidos en insectos individuales (n = 25-27), provenientes de tres réplicas biológicas.

DISCUSIÓN

Distintos trabajos han revelado que la capacidad de *T. rangeli* de invadir la hemolinfa, establecer la infección en glándulas salivares y modular la respuesta inmune de *R. prolixus* depende de la cepa y el estado de desarrollo del parásito (epimastigotes cortos o largos)[13,17-23]. En este sentido, teniendo en cuenta que los vectores son más susceptibles a las cepas de parásitos provenientes de la misma región geográfica, utilizamos en nuestros experimentos la cepa COACHI de *T. rangeli*, aislada de *R. prolixus* infectados naturalmente en Colombia[13,18]. Además, para simular la infección natural, realizamos las infecciones orales mediante alimentación desde ratones infectados, y utilizamos una dosis baja (50 epimastigotes) de parásitos cultivados *in vitro* para las infecciones sistémicas. Asimismo, discriminamos y analizamos un grupo de insectos que fueron solo infectados oralmente pero que presentaron infección en hemolinfa por pasaje "natural" del parásito desde el intestino (grupo G+H+Nat). De hecho, avalando un trabajo previo[13], encontramos resultados similares entre insectos que fueron infectados oralmente y luego inoculados con el parásito (grupo G+H+) y el grupo G+H+Nat, sugiriendo que nuestro diseño experimental puede ser usado para simular el efecto de *T. rangeli* en el vector durante el transcurso natural de la infección, al menos durante el periodo de tiempo evaluado.

En el presente trabajo, encontramos números similares de parásitos en la hemolinfa de insectos con infección sistémica, independientemente de la infección oral, indicando que la carga parasitaria en la cavidad celómica no es afectada por la presencia de *T. rangeli* en el intestino. Estos niveles fueron comparables a los encontrados en otros trabajos, sugiriendo que la carga de *T. rangeli* en hemolinfa llega a un *plateu* de aproximadamente

10^7-10^8 parásitos/ml[13,14].Por otro lado, detectamos elevados números de parásitos en el intestino del vector cuatro semanas luego de la infección oral. Si bien el recuento de parásitos lo realizamos sobre la totalidad del tracto digestivo, los valores hallados en nuestro trabajo superan a los reportados para las cepas Macias y H14[20,24]. Estas diferencias pueden deberse a las distintas metodologías empleadas para la infección, dado que en los trabajos mencionados se utilizaron alimentadores artificiales y cepas de *T. rangeli* que se mantienen exclusivamente en cultivo, lo que puede impactar en la infectividad del parásito.

Llamativamente, hallamos una cantidad de parásitos significativamente mayor en el intestino de insectos que también poseían infección sistémica, en comparación con aquellos que no fueron infectados en hemolinfa, sugiriendo que la carga de *T. rangeli* en intestino puede ser influenciada por la presencia del parásito en hemolinfa. De hecho, descubrimos una correlación positiva entre el número de parásitos en hemolinfa e intestino. Para confirmar la teoría que la presencia de *T. rangeli* en hemolinfa puede afectar la carga en el tracto digestivo, primero inoculamos los insectos con el parásito en hemolinfa y luego los infectamos oralmente. Siguiendo este diseño, encontramos mayor número de parásitos en el intestino de insectos que fueron infectados en hemolinfa, en comparación con los controles inoculados con PBS+LIT. En conjunto, demostramos por primera vez que la presencia de *T. rangeli* en hemolinfa afecta la infección intestinal, elevando el número de parásitos, un hallazgo que consideramos significativo en el transcurso natural de infecciones/re-infecciones.

Durante una infección, el sistema inmune de los insectos reconoce antígenos de patógenos como extraños, desencadenando distintas respuestas a través de las vías Toll, IMD y Jak/STAT, principalmente[7]. Varios estudios en distintas especies de insectos han demostrado que la presencia de parásitos en el tracto digestivo estimula la producción de AMPs en el cuerpo graso y su secreción a hemolinfa, incluso en ausencia de infección sistémica[25-28]. Luego, esos AMPs pueden difundir en el cuerpo del insecto, estableciendo una respuesta sistémica que tiende a disminuir la carga parasitaria en intestino frente a una infección oral[28]. Sin embargo, lo opuesto parece ocurrir cuando *T. rangeli* infecta *R. prolixus*. La infección oral impacta en la respuesta inmune del vector a nivel sistémico reprimiendo la activación profenoloxidasa en homolinfa, e inhibiendo la reacción de micro-agregación y fagocitosis en hemocitos, facilitando así la invasión y crecimiento del parásito en hemolinfa[20,22,24,29]. Además, *T. rangeli* también modula la expresión de AMPs y óxido nítrico de forma diferencial en intestino y cuerpo graso, y durante el transcurso del tiempo, a medida que el parasito prolifera y la infección se establece[20,21]. En este trabajo, nos planteamos como hipótesis que hay diferencias en la respuesta inmune sistémica gatilladas por *T. rangeli* durante la infección intestinal y/o en hemolinfa, y que estas diferencias pueden influenciar en el número de parásitos que se desarrollan en dichas regiones del cuerpo en *R. prolixus*.

Existen pocos reportes sobre las vías del sistema inmune activadas en *R. prolixus* durante una infección, y se asume que dichas vías funcionan como en otros insectos modelos[6,7,30]. Recientemente, se demostró que el factor de transcripción NF-κB *Rp-Relish* de la vía IMD regula la expresión de AMPs en respuesta a bacterias $Gram^+$ y $Gram^-$[31]. Además, cuando la expresión de *Rp-Relish* se silencia, la población de la bacteria simbionte *Rhodococcus rhodnii* incrementa en el tracto digestivo[30]. Sin embargo, al disminuir la expresión de *Rp-Relish* o de *Rp-Dorsal*, factor de transcripción NF-κB de la vía Toll, la carga de *T. cruzi* en intestino no se modifica[30]. Llamativamente, ha sido reportado que la infección con *T. cruzi* y *T. rangeli* modula la expresión de AMPs que se cree son regulados por las vías Toll e IMD del sistema inmune, sugiriendo que dichas vías son

funcionales en triatominos durante las infecciones parasitarias[20,32]. En este sentido, nuestros resultados indican que la vía IMD está reprimida en *R. prolixus* infectados con *T. rangeli* en intestino y/o hemolinfa, dado que demostramos una reducción del 70-75% en la expresión de *Rp-Relish* en insectos con infección oral y/o sistémica en comparación con insectos controles, sin cambios significativos en la expresión del inhibidor *Rp-Caspar*. Además, nuestros resultados también apuntan a una represión de la vía Toll en insectos infectados oralmente, que puede revertirse cuando el parásito infecta la hemolinfa, ya que no evidenciamos diferencias significativas en la expresión de *Rp-Dorsal*, pero una expresión 2-4 veces mayor del inhibidor *Rp-Cactus* en el grupo G+H- en comparación con insectos controles y con infección intestinal y en hemolinfa. Asimismo, comprobamos la existencia de una asociación entre las vías IMD y Toll de *R. prolixus* con la carga de *T. rangeli*. Hallamos una correlación negativa entre el número de parásitos en intestino y la expresión de *Rp-Relish* y *Rp-Cactus*, sugiriendo que números elevados de *T. rangeli* en el tracto digestivo pueden incrementar la represión a nivel sistémico de la vía IMD y disminuir la represión de la vía Toll en *R. prolixus* con infección oral. Por otro lado, detectamos una correlación negativa entre la carga parasitaria en hemolinfa y la expresión de *Rp-Relish*, sugiriendo una reducción en la activación de la vía IMD a medida que aumenta el número de parásitos en insectos con infección sistémica. Reforzando nuestras conclusiones, un estudio reciente evidenció una reducción en la carga intestinal de *T. cruzi* cuando *R. prolixus* es tratado con IMD-0354,una droga que impide la activación de factores de transcripción NF-κB[15]. De igual manera, trabajos en *Anopheles gambiae*, *Glossina morsitans*, *Phlebotomus papatasi* y *Aedes aegypti* infectados con distintos parásitos (*Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp. y *Leishmania* sp.) demostraron que la expresión de *Relish* y *Cactus* regula la intensidad y prevalencia de la infección, resaltando la importancia de las vías Toll e IMD de insectos vectores en la respuesta inmune anti-parasitaria[33-37].

El factor de transcripción *Rp-STAT* fue identificado por primera vez en *R. prolixus* por análisis de transcriptomas de tracto digestivo[38]. Luego, distintos miembros de la vía Jak/STAT fueron identificados en análisis de transcriptomas de *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis*, y en el genoma de *R. prolixus*, sugiriendo que esta vía es funcional en triatominos[6,30]. Sin embargo, hasta el momento no ha sido estudiada la expresión y función de esta vía en vinchucas durante infecciones microbianas. En este trabajo, no encontramos correlación entre el número de parásitos en tracto digestivo o hemolinfa y la expresión de *Rp-STAT*, sugiriendo que la vía Jak/STAT no es modulada por la carga de *T. rangeli* en *R. prolixus* durante la infección. Llamativamente, en comparación con insectos no infectados, demostramos una reducción del 60-75% aproximadamente en la expresión de *Rp-STAT* en todos los grupos de insectos con infección en hemolinfa, apuntando a una represión de la vía Jak/STAT cuando *T. rangeli* infecta el hemocele, independientemente de la presencia de parásitos en el tracto digestivo. Dada la disminución en la expresión de *Rp-STAT* en insectos con infección sistémica, este factor de transcripción podría ser el nexo entre la presencia de *T. rangeli* en hemolinfa y el aumento en el número de parásitos en el tracto digestivo, ya que la represión sistémica de la vía Jak/STAT influenciaría en la carga parasitaria intestinal. De hecho, de la mano con esta teoría, se ha demostrado que la inhibición de la expresión de *STAT* incrementa el número de *Plasmodium vivax* presentes en el intestino de *Anopheles aquasalis*, y eleva la carga intestinal de *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum* en *Anopheles gambiae*[39,40]. Otros estudios son necesarios para confirmar el rol anti-parasitario de esta vía en triatominos.

En los últimos años se ha focalizado la atención en el estudio de la respuesta inmune de insectos, con el propósito de identificar blancos para el desarrollo de nuevas estrategias de control de las enfermedades transmitidas por vectores[41,42]. Es interesante que *T. cruzi* reside y se desarrolla exclusivamente en el tracto digestivo de triatominos, y es eliminado rápidamente por el sistema inmune si se encuentra en hemolinfa[14]; mientras que *T. rangeli* infecta y se desarrolla en la hemolinfa y las glándulas salivales de *R. prolixus*[5]. Nuestros resultados sugieren una represión de las tres vías del sistema inmune, Toll, IMD y Jak/STAT, en *R. prolixus* durante la infección con *T. rangeli*, lo que podría explicar cómo este parásito es capaz de infectar distintas regiones del insecto, aportando así nuevos conocimientos sobre el rol del sistema inmune en el establecimiento de infecciones en triatominos. En base a nuestros resultados, planteamos el siguiente posible escenario: al infectar el tracto digestivo de *R. prolixus*, *T. rangeli* disminuye la activación de las vías Toll e IMD, favoreciendo la infección en esta región del insecto. Asimismo, esta modulación del sistema inmune permite la multiplicación de los primeros parásitos que invaden la hemolinfa, que proliferan y establecen la infección sistémica mediante la represión no sólo de la vía IMD sino también de la vía Jak/STAT. En consecuencia, los parásitos intestinales también se ven favorecidos con esta inhibición y aumentan su número.

Por otro lado, nuestro trabajo abre nuevas y desafiantes preguntas: ¿Cuáles son los mecanismos efectores gatillados por cada una de las vías del sistema inmune para modificar la carga de *T. rangeli*? ¿Es necesaria la disminución en la activación de la vía Jak/STAT para que el parásito infecte las glándulas salivales? ¿Podemos evitar que el parásito invada la hemolinfa de insectos infectados oralmente mediante la activación de alguna de las vías del sistema inmune? Experimentos de RNAi/CRISPR utilizando como blanco a los factores de transcripciones e inhibidores estudiados en el presente trabajo podrán dilucidar estas cuestiones.

BIBLIOGRAFÍA

1 Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E. & Macedo, A. M. Species specific detection of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta tropica***72**, 203-212 (1999).

2 Vieira, C. B. *et al.* Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Frontiers in cellular and infection microbiology***8**, 405, doi:10.3389/fcimb.2018.00405 (2018).

3 Guarneri, A. A. & Lorenzo, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *Journal of insect physiology***97**, 66-76, doi:10.1016/j.jinsphys.2016.07.005 (2017).

4 Hecker, H., Schwarzenbach, M. & Rudin, W. Development and interactions of Trypanosoma rangeli in and with the reduviid bug Rhodnius prolixus. *Parasitology research***76**, 311-318, doi:10.1007/bf00928185 (1990).

5 Azambuja, P. *et al.* Rhodnius prolixus: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. *Journal of insect physiology***97**, 45-65, doi:10.1016/j.jinsphys.2016.11.006 (2017).

6 Zumaya-Estrada, F. A., Martinez-Barnetche, J., Lavore, A., Rivera-Pomar, R. & Rodriguez, M. H. Comparative genomics analysis of triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods. *Parasites & vectors***11**, 48, doi:10.1186/s13071-017-2561-2 (2018).

7 Salcedo-Porras, N. & Lowenberger, C. The innate immune system of kissing bugs, vectors of chagas disease. *Developmental and comparative immunology***98**, 119-128, doi:10.1016/j.dci.2019.04.007 (2019).

8 Gourbiere, S., Dorn, P., Tripet, F. & Dumonteil, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity***108**, 190-202, doi:10.1038/hdy.2011.71 (2012).

9 Boulanger, N., Bulet, P. & Lowenberger, C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in parasitology***22**, 262-268, doi:10.1016/j.pt.2006.04.003 (2006).

10 Ursic-Bedoya, R. J. & Lowenberger, C. A. Rhodnius prolixus: identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. *Developmental and comparative immunology***31**, 109-120, doi:10.1016/j.dci.2006.05.008 (2007).

11 Elder, B. L., Trujillo, I. & Blazevic, D. J. Rapid deoxyribonuclease test with methyl green. *Journal of clinical microbiology***6**, 312-313 (1977).

12 Rodrigues Jde, O., Lorenzo, M. G., Martins-Filho, O. A., Elliot, S. L. & Guarneri, A. A. Temperature and parasite life-history are important modulators of the outcome of Trypanosoma rangeli-Rhodnius prolixus interactions. *Parasitology***143**, 1459-1468, doi:10.1017/S0031182016001062 (2016).

13 Ferreira, L. L., Lorenzo, M. G., Elliot, S. L. & Guarneri, A. A. A standardizable protocol for infection of Rhodnius prolixus with Trypanosoma rangeli, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. *Journal of invertebrate pathology***105**, 91-97, doi:10.1016/j.jip.2010.05.013 (2010).

14 Mello, C. B., Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A. & Azambuja, P. Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli: interplay with hemolymph components of Rhodnius prolixus. *Journal of invertebrate pathology***65**, 261-268, doi:10.1006/jipa.1995.1040 (1995).

15 Vieira, C. S. *et al.* The NF-kappaB Inhibitor, IMD-0354, Affects Immune Gene Expression, Bacterial Microbiota and Trypanosoma cruzi Infection in Rhodnius prolixus Midgut. *Frontiers in physiology***9**, 1189, doi:10.3389/fphys.2018.01189 (2018).

16 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research***29**, e45, doi:10.1093/nar/29.9.e45 (2001).

17 Grisard, E. C. *et al.* Characterization of Trypanosoma rangeli strains isolated in Central and South America: an overview. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz***94**, 203-209, doi:10.1590/s0074-02761999000200015 (1999).

18 Machado, P. E. *et al.*Differential susceptibility of triatomines of the genus Rhodnius to Trypanosoma rangeli strains from different geographical origins. *International journal for parasitology***31**, 632-634, doi:10.1016/s0020-7519(01)00150-3 (2001).

19 Whitten, M. M. *et al.* Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in Rhodnius prolixus (Reduviidae)/Trypanosoma rangeli interactions. *Experimental parasitology***98**, 44-57, doi:10.1006/expr.2001.4615 (2001).

20 Vieira, C. S. *et al.* Rhodnius prolixus interaction with Trypanosoma rangeli: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasites & vectors***8**, 135, doi:10.1186/s13071-015-0736-2 (2015).

21 Whitten, M. *et al.* Differential modulation of Rhodnius prolixus nitric oxide activities following challenge with Trypanosoma rangeli, T. cruzi and bacterial cell wall components. *Insect biochemistry and molecular biology***37**, 440-452, doi:10.1016/j.ibmb.2007.02.001 (2007).

22 Figueiredo, M. B., Genta, F. A., Garcia, E. S. & Azambuja, P. Lipid mediators and vector infection: Trypanosoma rangeli inhibits Rhodnius prolixus hemocyte phagocytosis by modulation of phospholipase A2 and PAF-acetylhydrolase activities. *Journal of insect physiology***54**, 1528-1537, doi:10.1016/j.jinsphys.2008.08.013 (2008).

23 Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N. & Meyer-Fernandes, J. R. Rhodnius prolixus: modulation of antioxidant defenses by Trypanosoma rangeli. *Experimental parasitology***145**, 118-124, doi:10.1016/j.exppara.2014.08.002 (2014).

24 Gomes, S. A., Feder, D., Garcia, E. S. & Azambuja, P. Suppression of the prophenoloxidase system in Rhodnius prolixus orally infected with Trypanosoma rangeli. *Journal of insect physiology***49**, 829-837, doi:10.1016/S0022-1910(03)00133-1 (2003).

25 Boulanger, N. *et al.* Immune response of Drosophila melanogaster to infection with the flagellate parasite Crithidia spp. *Insect biochemistry and molecular biology***31**, 129-137, doi:10.1016/s0965-1748(00)00096-5 (2001).

26 Boulanger, N., Brun, R., Ehret-Sabatier, L., Kunz, C. & Bulet, P. Immunopeptides in the defense reactions of Glossina morsitans to bacterial and Trypanosoma brucei brucei infections. *Insect biochemistry and molecular biology***32**, 369-375, doi:10.1016/s0965-1748(02)00029-2 (2002).

27 Hao, Z. *et al.* Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***98**, 12648-12653, doi:10.1073/pnas.221363798 (2001).

28 Boulanger, N. *et al.* Characterization of a defensin from the sand fly Phlebotomus duboscqi induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite Leishmania major. *Infection and immunity***72**, 7140-7146, doi:10.1128/IAI.72.12.7140-7146.2004 (2004).

29 Garcia, E. S., Machado, E. M. & Azambuja, P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in Rhodnius prolixus larvae orally infected with Trypanosoma rangeli. *Experimental parasitology***107**, 31-38, doi:10.1016/j.exppara.2004.03.015 (2004).

30 Mesquita, R. D. *et al.*Genome of Rhodnius prolixus, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***112**, 14936-14941, doi:10.1073/pnas.1506226112 (2015).

31 Salcedo-Porras, N., Guarneri, A., Oliveira, P. L. & Lowenberger, C. Rhodnius prolixus: Identification of missing components of the IMD immune signaling pathway

and functional characterization of its role in eliminating bacteria. *PloS one***14**, e0214794, doi:10.1371/journal.pone.0214794 (2019).

32 Vieira, C. S. *et al.* Impact of Trypanosoma cruzi on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of Rhodnius prolixus. *Parasites & vectors***9**, 119, doi:10.1186/s13071-016-1398-4 (2016).

33 Antonova, Y., Alvarez, K. S., Kim, Y. J., Kokoza, V. & Raikhel, A. S. The role of NF-kappaB factor REL2 in the Aedes aegypti immune response. *Insect biochemistry and molecular biology***39**, 303-314, doi:10.1016/j.ibmb.2009.01.007 (2009).

34 Meister, S. *et al.* Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito Anopheles gambiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***102**, 11420-11425, doi:10.1073/pnas.0504950102 (2005).

35 Louradour, I., Ghosh, K., Inbar, E. & Sacks, D. L. CRISPR/Cas9 Mutagenesis in Phlebotomus papatasi: the Immune Deficiency Pathway Impacts Vector Competence for Leishmania major. *mBio***10**, doi:10.1128/mBio.01941-19 (2019).

36 Hu, C. & Aksoy, S. Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly Glossina morsitans morsitans. *Molecular microbiology***60**, 1194-1204, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05180.x (2006).

37 Frolet, C., Thoma, M., Blandin, S., Hoffmann, J. A. & Levashina, E. A. Boosting NF-kappaB-dependent basal immunity of Anopheles gambiae aborts development of Plasmodium berghei. *Immunity***25**, 677-685, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.019 (2006).

38 Ribeiro, J. M. *et al.* An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, Rhodnius prolixus. *PLoS neglected tropical diseases***8**, e2594, doi:10.1371/journal.pntd.0002594 (2014).

39 Gupta, L. *et al.* The STAT pathway mediates late-phase immunity against Plasmodium in the mosquito Anopheles gambiae. *Cell host & microbe***5**, 498-507, doi:10.1016/j.chom.2009.04.003 (2009).

40 Bahia, A. C. *et al.* The JAK-STAT pathway controls Plasmodium vivax load in early stages of Anopheles aquasalis infection. *PLoS neglected tropical diseases***5**, e1317, doi:10.1371/journal.pntd.0001317 (2011).

41 Shaw, W. R. & Catteruccia, F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature microbiology***4**, 20-34, doi:10.1038/s41564-018-0214-7 (2019).

42 Baxter, R. H., Contet, A. & Krueger, K. Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases. *Biochemistry***56**, 907-918, doi:10.1021/acs.biochem.6b00870 (2017).

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is the second most common American trypanosome that infects man. It is vectored by triatomines from the genus *Rhodnius*, in which it invades the hemolymph and infects the salivary glands, avoiding the bug immune responses. In insects, these responses are initiated by well conserved pathways, mainly the IMD, Toll and Jak/STAT. We hypothesize that *T. rangeli* infection in the gut or hemolymph of

Rhodnius prolixus triggers different immune pathways, which influence the number of parasites that survive inside the vector. Thus, we investigated groups of insects with infections in the gut and/or hemolymph, and evaluated parasite loads and expression of transcription factors (*Rp-Relish*, *Rp-Dorsal* and *Rp-STAT*) and inhibitors (*Rp-Cactus* and *Rp-Caspar*) of the IMD, Toll and Jak/STAT pathways. We detected lower parasite counts in the gut of insects without hemolymph infection, compared to hemolymph-infected groups. Besides, we measured higher parasite numbers in the gut of bugs that were first inoculated with *T. rangeli* and then fed on infected mice, compared with control insects, indicating that hemolymph infection increases parasite numbers in the gut. Interestingly, we observed that genes from the three immune pathways where differentially modulated, depending on the region parasites were present, as we found (1) *Rp-Relish* downregulated in gut-and/or-hemolymph-infected insects, compared with controls; (2) *Rp-Cactus* upregulated in gut-infected insect, compared with controls and gut-and-hemolymph-infected groups; and (3) *Rp-STAT* downregulated in all groups of hemolymph-infected insects. Finally, we determined negative correlations between parasite loads in the gut and *Rp-Relish* and *Rp-Cactus* expression, and between parasite counts in the hemolymph and *Rp-Relish* levels, indicating an association between parasite numbers and the IMD and Toll pathways. Overall, our findings reveal new players in *R. prolixus*-*T. rangeli* interactions that could be key for the capacity of the bug to transmit the pathogen.

PREVALENCIA Y CORRELACIÓN CLÍNICA DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO CONVENCIONALES EN PACIENTES CON SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO OBSTÉTRICO SERONEGATIVO

Analía Sánchez-Luceros, María Fabiana Alberto, Macarena Asessio

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El término de síndrome antifosfolipídico (SAF) se utiliza para definir la asociación entre un criterio clínico que involucra trombosis venosas y/o trombosis arteriales y/o morbilidad obstétricas, y la presencia de al menos un tipo de anticuerpos antifosfolípidos (AF). El SAF puede ser primario o secundario a la presencia de enfermedades como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoidea o las neoplasias.

Los AF aceptados como criterio de laboratorio (Miyakis S, 2006) son: el anticoagulante lúpico (AL), anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) IgG ó IgM de título medio o alto y los anticuerpos anti-beta 2 glicoproteína 1 (anti-B2GP1) IgG ó IgM superiores al percentilo 99%; que demuestren persistencia en el tiempo. EL diagnóstico de SAF se realiza frente a la presencia de al menos un criterio clínico y uno de laboratorio.

El SAF obstétrico es un desorden heterogéneo que debe categorizarse de acuerdo al tipo de morbilidad obstétrica en: a) muerte fetal (MF), b) recién nacidos pre término debido a restricción del crecimiento intrauterino (RNPT), insuficiencia placentaria, preeclampsia, desprendimiento prematuro de placenta, síndrome HELLP, c) abortos recurrentes (AbR) sin otra explicación (Miyakis S, 2006). Es la trombofilia más frecuente y una de las pocas causas tratables de las alteraciones de embarazo.

La asociación patológica entre la presencia de AF y las alteraciones del embarazo ha sido puesta en evidencia en diversos ensayos in vitro e in vivo. En este sentido se ha demostrado que los AF inducen cambios sobre las células trofobásticas (generando una menor capacidad de migración y proliferación), la secreción de moléculas antiagiogénicas, la secreción de mediadores inflamatorios (interleuquinas IL8 e IL1beta). También se ha demostrado que parte del daño celular es mediado por activación del sistema del complemento. Estos mecanismos en conjunto conducen a la activación de células endoteliales, monocitos y plaquetas generando un ambiente donde coexisten hipercoagulabilidad e inflamación (Schereiber K, 2018).

El tratamiento habitual preventivo del SAF obstétrico se basa en la administración de heparina asociada a aspirina en bajas dosis. El manejo de las pacientes con SAF obstétrico debe ser multidisciplinario y la elección del tratamiento individualizada, ya que se basa en estudios de valor científico relativo.

El concepto de SAF clínico o seronegativo fue introducido en 2003 por Hughes (Hughes GR, 2003), para describir un grupo de pacientes con manifestaciones clínicas de SAF sin

la evidencia de laboratorio de AF. Una series de estudios registran la participación de otros tipos de antígenos y de anticuerpos llamados “no convecionales” dado que no se encuentran incluidos dentro de los criterios de laboratorio, tales como: anticuerpos anti-fosfatidiletanoamina (anti-PE), anti-fosfatidilserina (anti-PS), anti-ácido fosfatídico, anti-anexina V, anti-aniexina II (anti-AII), anti-vimentina/cardiolipina, anti-protrombina/fosfatidilserina (anti-PS/PT) (Alessandri C, 2011; Nayfe R, 2013).

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de los AF no convencionales anti-PS, anti-PS/PT y anti-AII, en mujeres con criterios clínicos de SAF obstétrico (CC de SAF obstétrico), en quienes los AF incluidos en los criterios de laboratorio (AF CL) fueron negativos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio.

En septiembre de 2018 se inició un estudio caso-control de pacientes con criterios de SAF obstétricos en el Departamento de Hemostasia y Trombosis del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Los resultados presentados corresponden a las pacientes incluidas durante el período septiembre 2018-enero 2020.

Los criterios de inclusión para el estudio abarcaron a aquellas pacientes con criterios clínicos de SAF obstétrico (CC de SAF obstétrico), pacientes con criterios clínicos incompletos de SAF obstétrico (CI de SAF obstétrico) y mujeres sin morbilidad obstétrica que constituyeron la población control normal (CN). Los datos clínicos fueron recopilados de las historias clínicas de las pacientes, luego de obtener el consentimiento informado de las mismas para participar en este estudio. Una vez enroladas se procedió a realizar las determinaciones de laboratorio.

Una vez obtenidos los resultados de los estudios de laboratorio para anticuerpos antifosfolípidos considerados como criterio de laboratorio (AF CL), las pacientes fueron categorizadas en cuatro grupos:

- SAF obstétrico seronegativo: constituido por pacientes CC de SAF obstétrico sin criterios de laboratorio, en quienes se descartó alguna causa de origen genético y/o clínico y/o de incompatibilidad inmunológica o la presencia de trombofilia hereditaria y/o adquirida. Este grupo, que representó el grupo objetivo de estudio del presente trabajo, se incluyeron 31 pacientes.
- SAF obstétrico confirmado: constituido por pacientes con CC de SAF obstétrico y AF CL positivos, en quienes se descartó alguna causa de origen genético y/o clínico y/o de incompatibilidad inmunológica o la presencia de trombofilia. En este grupo se incluyeron 54 pacientes.
- CI SAF obstétrico: constituido por pacientes con patología del embarazo que no cumplen los CC para SAF obstétrico (< de dos abortos), en quienes se descartó alguna causa de origen genético y/o clínico y/o de incompatibilidad inmunológica o la presencia de trombofilia hereditaria y/o adquirida. En este grupo se incluyeron 34 pacientes.
- Control normal (CN): integrado por 40 mujeres sanas, que no presentaron historia de complicación en los embarazos y que fueron negativas para las pruebas de AF CL.

Determinación de AL, aCL y anti-B2GP1 (AF CL).

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa con ayuno de 12 horas. Las muestras fueron anticuoaguladas con citrato de sodio 3.2% (1 volumen de anticoagulante 9 de sangre) para los estudios de coagulación y ensayos en fase sólida, y EDTA 10% para los hemogramas. El plasma pobre en plaquetas fue preparado por doble centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los estudios básicos de coagulación se realizaron en el día dentro de las tres horas de obtenida la muestra (actividad de protrombina, tiempo de protrombina parcial activado, fibrinógeno, factor VIII, factor IX, tiempo de trombina). Las determinaciones AF CL y no convencionales, se realizaron en muestras fraccionadas y guardadas a -20 ºC hasta el momento de análisis. Cada análisis fue realizado con una fracción independiente descongelada a 37 ºC. Las pruebas básicas de coagulación se realizaron con las técnicas estándares que se emplean en el laboratorio. La detección AL, se realizó aplicando los criterios y las recomendaciones del Subcomité de Estandarización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Devreese KMJ, 2020) y se informó como una variable categórica: AL negativo (AL N) o AL positivo (AL P). Las determinaciones de aCL y anti-β2GPI, se realizaron por técnicas de enzimoinmuno-ensayo en fase sólida (ELISA) comerciales (INOVA) que reúnen los criterios sugeridos por los expertos de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (Tincani A, 2004). Los resultados para aCL IgG e IgM, fueron expresados en unidades GPL y MPL de acuerdo al material de calibración incluido en el kit comercial, con valores de corte correspondientes al percentilo 99% (IgG > 15 GPL, IgM >18 MPL). Los de resultados de anti-β2GPI IgG e IgM fueron expresados en unidades arbitrarias G (UAG) y unidades arbitrarias M (UAM), de acuerdo al material de calibración incluido en el kit comercial, con valores de corte correspondientes al percentilo 99%nuestro (IgG > 20 UAG, IgM >20 UAM).

Determinación de AF no convencionales.

Anticuerpos anti-PS y anti-PS/PT.

El ensayo para anticuerpos anti-PS y anti-PS/PT se realizó en paralelo, de acuerdo a Amengual y col. (Amengual O, 2014) con algunas modificaciones. Cincuenta uL de una solución de fosfatidilserina (PS) 50 ug/ml disuelta en etanol absoluto fueron dispensados en dos placas de 96 pocillos de poliestireno Polisorb (Nunc) procesadas en paralelo. Luego de 20 horas de reposo a temperatura ambiente para evaporación del solvente, ambas placas fueron bloqueadas con 50 uL de una solución de albúmina bovina al 1% disuelta en tampón tris salino, pH 7.4, 5 mM de cloruro de calcio (TBS-Ca2+) durante 1 hora a 37°. Posteriormente una de las placas fue saturada durante una hora a 37° con una 50 uL de una solución de PT humana 5 ug/mL (Stago) disuelta en TBS-Ca2+, y la placa procesada en paralelo sin PT solo con TBS-Ca2+ para la detección de anticerpos anti-PS. Para el análisis las muestras de plasmas a fueron diluidas 1/100 en TBS-Ca2+ y 50 uL de cada dilución fueron dispensadas en ambas placas. Las muestras fueron analizadas por triplicado y fueron incubadas durante 1 hora a 25°C. Luego de tres lavados con TBS-Ca2+-Tween20 0,005%, 50 uL de una dilución adecuada de los antisueros anti-IgG y anti-IgM marcados con peroxidasa fueron incubados durante 60 minutos a 25°C. Finalmente, luego de tres lavados con TBS-Ca2+-Tween20 0,005%, 50 uL del sustrato TMB (Sigma) fueron dispensados y la reacción de color fue inhibida a los 15 minutos con SO_4H_2 0,5 M y se realizó la lectura de densidades ópticas (DO) en un lector de microplacas a 450 nm. Los resultados de anticuerpos anti-PS fueron expresados en DO y correspondieron a aquellos obtenidos en la placa procesada en paralelo que no contiene PT. Los resultados de anticuerpos anti-PS/PT fueron expresados en DO y su reactividad

se calculó como la diferencia en DO obtenidas entre la placa saturada con PS y PT y la placa que solo contiene PS (Figura1). Los valores de corte fueron calculados como el parecentil 99% a partir de los resultados obtenidos con los CN tanto para anti-PD (IgG >0.4 DO ; IgM > 0.5 DO) como para anti-PS/PT (IgG >0.044 DO; IgM >0.066 DO).

Anticuerpos anti-AII.

La determinación de anticuerpos anti-Anexina II (anti-AII, isotipos IgG e IgM) se realizó de acuerdo a Salle y col. (Salle V, 2016). Una solución de Anexina II recombinante, 1 ug/mL, disuelta en tampón de fosfato salino pH 7.4 (PBS), fue dispensada en una placa de 96 pocillos de poliestireno de alta capacidad de unión (Maxisorb, Nunc); esta permaneció durante 24 horas a 4°C. En paralelo, como control de unión inespecífica, se procesó una placa en idénticas condiciones que fue tratada con PBS sin Anexina II. Como solución de bloqueo se empleó una solución de albúmina bovina al 3% disuelta en PBS (PBS-Alb) que fue incubada durante una hora a 37°C. Para el análisis de las muestras de plasmas, estas fueron diluidas 1/100 en PBS-Alb y 100 uL de cada dilución fueron dispensadas por duplicado e incubadas por 1 hora a 25°C en ambas placas. Luego de tres lavados con PBS-Tween 0.1%, 100 uL de una dilución adecuada en PBS-Alb de los antisueros anti-IgG y anti IgM marcados con peroxidasa fueron incubados 30 minutos a 25°C. Luego de tres lavados con PBS-Tween 0.1%, 100 uL del sustrato TMB fueron dispensados y la reacción de color fue inhibida a los 15 minutos con SO_4H_2 0,5 M y se realizó la lectura de DO en un lector de microplacas a 450 nm. Los de resultados de anti-AII IgG e IgM fueron expresados DO x100, y surgieron de la diferencia de las DO obtenidas entre la placa con AII y la placa sin AII que determina la unión inespecífica. Los valores de corte fueron calculados como el parecentil 99% a partir de los resultados obtenidos con los CN (IgG > 28 DO , IgM >32 DO).

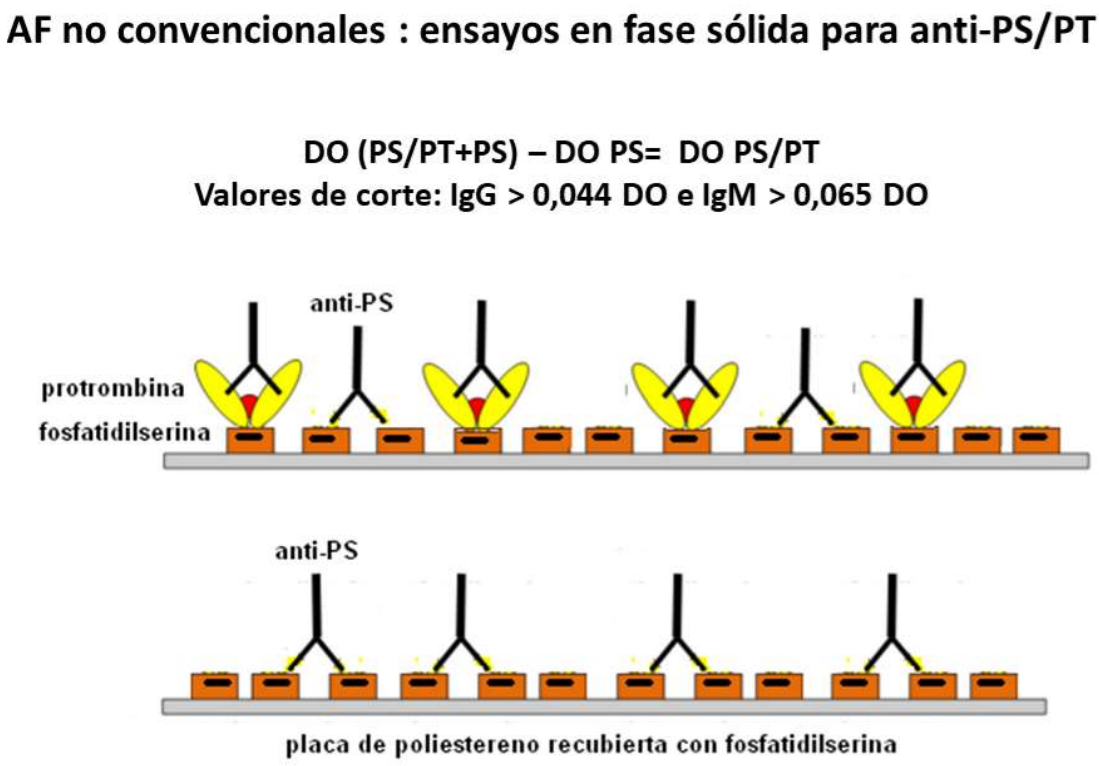


Figura 1

RESULTADOS

En una primera etapa las pacientes fueron seleccionadas en función de cumplir con los criterios clínicos de SAF obstétrico (SAF CC). De manera paralela se incorporaron pacientes con criterios incompletos de SAF obstétrico (SAF CI) y controles normales (CN).

Posteriormente en función de los resultados de laboratorio que se emplearon para la detección de anticuerpos antifosfolípidos considerados criterios de laboratorio (AF CL) se categorizaron las pacientes con SAF CC en dos grupos: SAF obstétrico seronegativo y SAF obstétrico confirmado.

En una primera instancia, comparando la prevalencia de los AF CL en los grupos con de pacientes con criterios clínicos (SAF CC) versus aquellas con criterios incompletos (SAF CI), la prevalencia de AF CL fue significativamente superior en el grupo SAF CC (54/85) vs SAF CI (12/34) p: 0.007 (Figura 2). En estos grupos el AF CL prevalente fue el anticoagulante lúpico (AL) dado que este fue positivo en el 96% (52/54) de las pacientes con SAF CC y en el 100% de SAF CI.

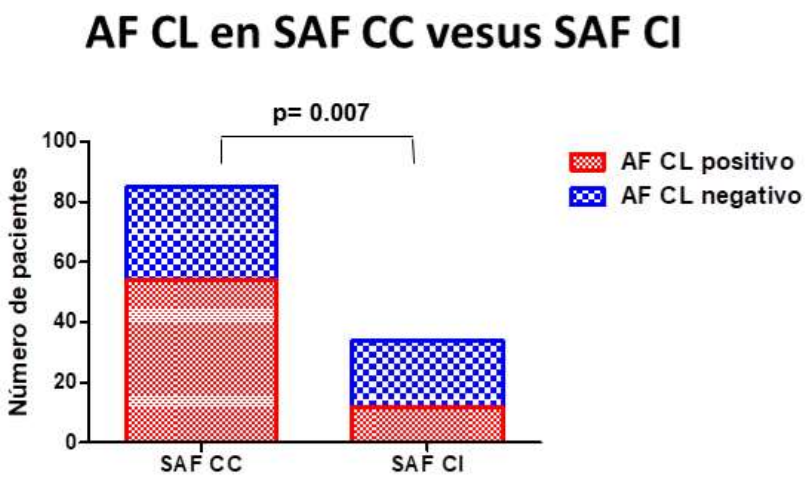


Figura 2

Con respecto a los anticuerpos considerados criterios de laboratorio cuya detección se realiza por ELISA, solo 4/54 pacientes SAF obstétrico confirmado presentaron niveles aumentados 2 para el isotipo IgG y 2 para el sitipo IgM (Figura 3).

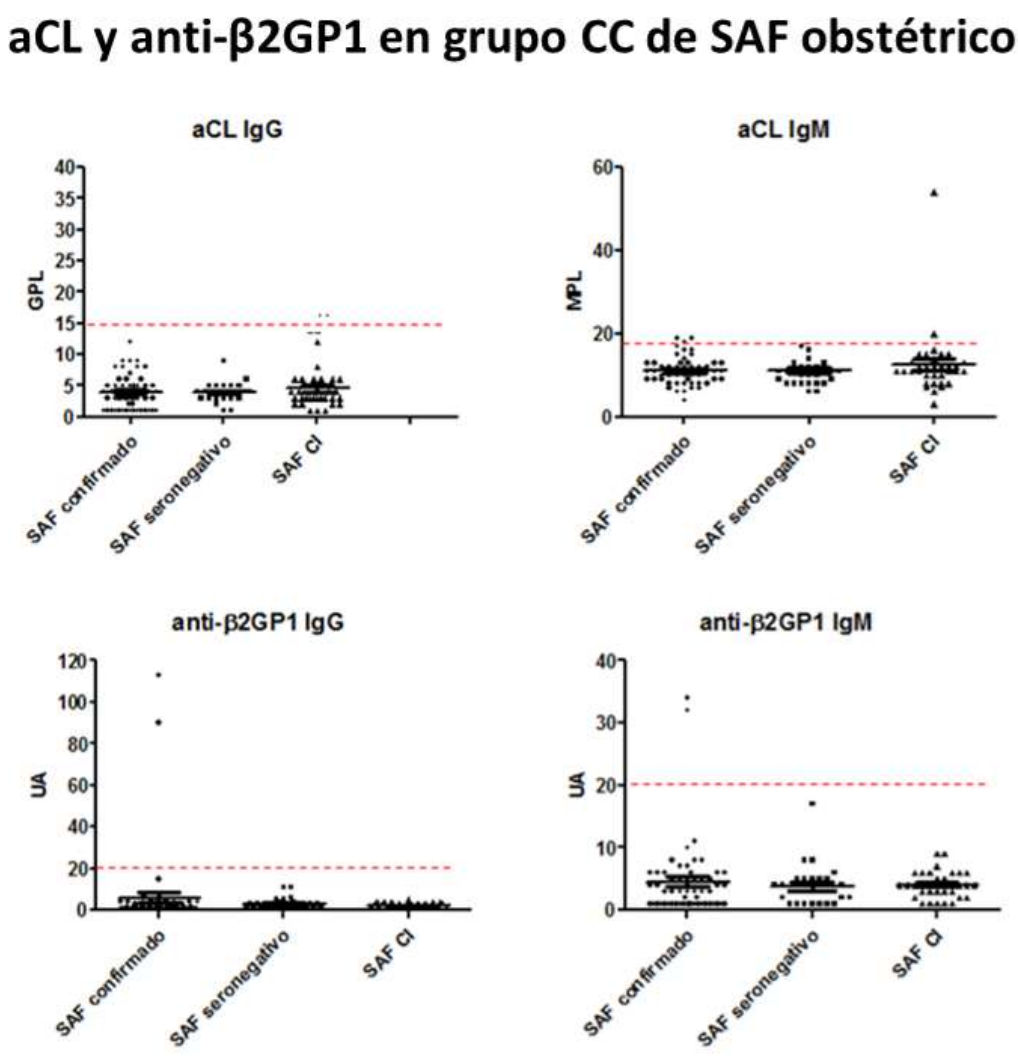


Figura 3

Con respecto a la morbilidad obstétrica presentada por las pacientes categorizadas SAF obstétrico seronegativo y SAF obstétrico confirmado, las características se presentan en la tabla a continuación, y esta no fue significativamente diferente entre ambos grupos.

SAF obstétrico confirmado y SAF obstétrico seronegativo: morbilidad obstétrica

Morbilidad obstétrica	SAF confirmando	SAF seronegarivo
MF	33% (18/54)	44% (14/31)
RNPT	11% (6/54)	16% (5/31)
AbR	56% (30/54)	39% (12/31)

Las diferencias no son significativas

Para los anticuerspos anti-PS, las prevalencias en el grupo SAF obstétrico seronegativo fueron: anti-PS IgG 3% (1/31) y anti-PS IgM 29% (9/31); y en el grupo SAF obstétrico confirmado: anti-PS IgG 4% (2/54) y anti-PS IgM 41% (22/54) (Figura 4).

AF no convencionales en SAF obstétrico seronegativo: anti- PS IgG e IgM

SAF seronegativo: 3% (1/31) anti-PS IgG +
29% (9/31) anti-PS IgM +

Prevalencias no significativas vs SAF confirmado.

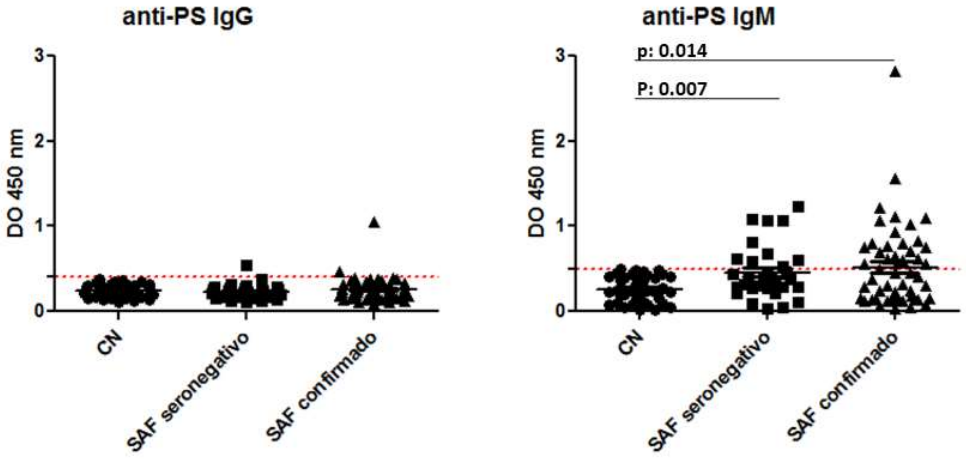


Figura 4

Como se ve, las medias en DO de los anti-PS IgM en el grupo SAF seronegativo son significativamente superiores con respecto a la población CN (P: 0.007). Esto mismo se observa en la población SAF confirmado con respecto a la población CN (P: 0.0014).

Para los anticuerpos anti-PS/PT, las prevalencias en el grupo SAF obstétrico seronegativo fueron: anti-PS/PT IgG 3% (1/31) y anti-PS/PT IgM 3% (1/31); y en el grupo SAF obstétrico confirmado: anti-PS/PT IgG 2% (1/54) y anti-PS/PT IgM 11% (5/54) (Figura 5).

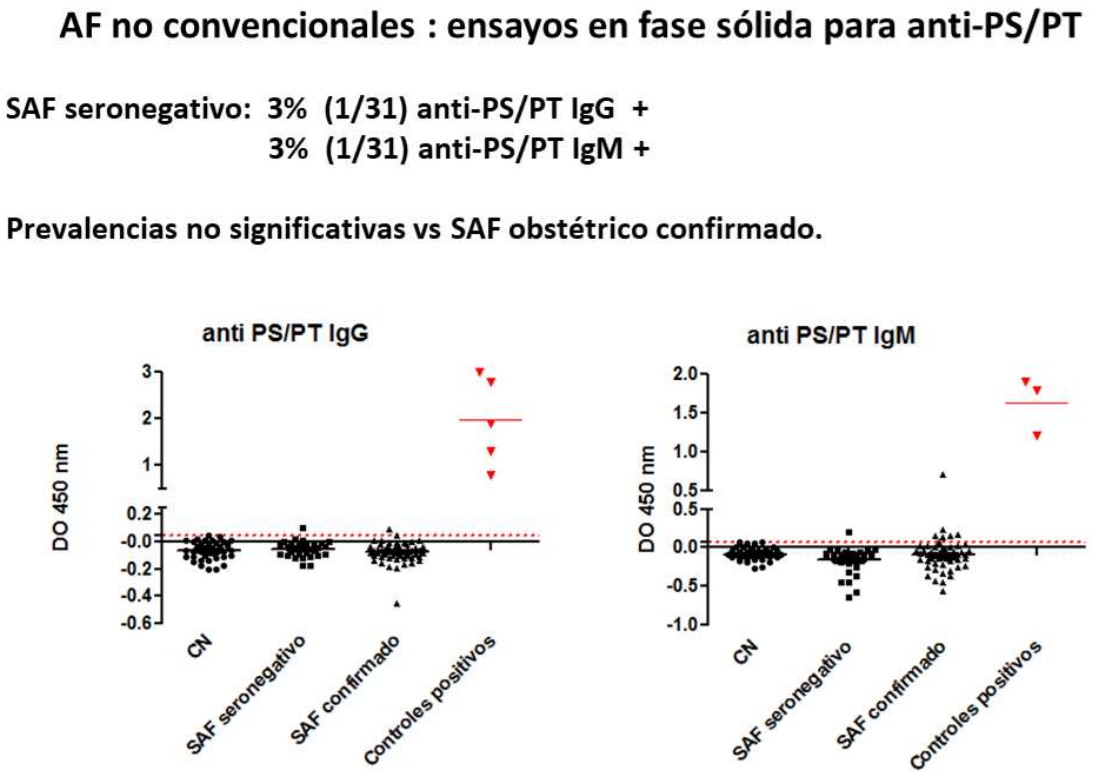


Figura 5

Como se ve, para todos los grupos numerosos resultados dan valores negativos en DO y esto se debe a que el cálculo de la reactividad de los anti-PS/PT surge de restar la actividad de unión a PS en ausencia de protrombina. Se incluyeron en el gráfico los resultados de los controles positivos para ambos isotipos confirmando la reactividad de la protrombina unida a la PS.

Para los anticuerpos anti-AII, las prevalencias en el grupo SAF obstétrico seronegativo fueron: anti-AII IgG 17% (5/31) y anti-AII IgM 3% (1/31); y en el grupo SAF obstétrico confirmado: anti-AII IgG 26% (14/54) y anti-AII IgM 11% (6/54) (Figura 6).

AF no convencionales en SAF obstétrico seronegativo: anti- AII IgG e IgM

SAF seronegativo: 17% (5/31) anti-AII IgG +
3 % (1/31) anti-AII IgM +

Prevalencias no significativas vs SAF confirmado.

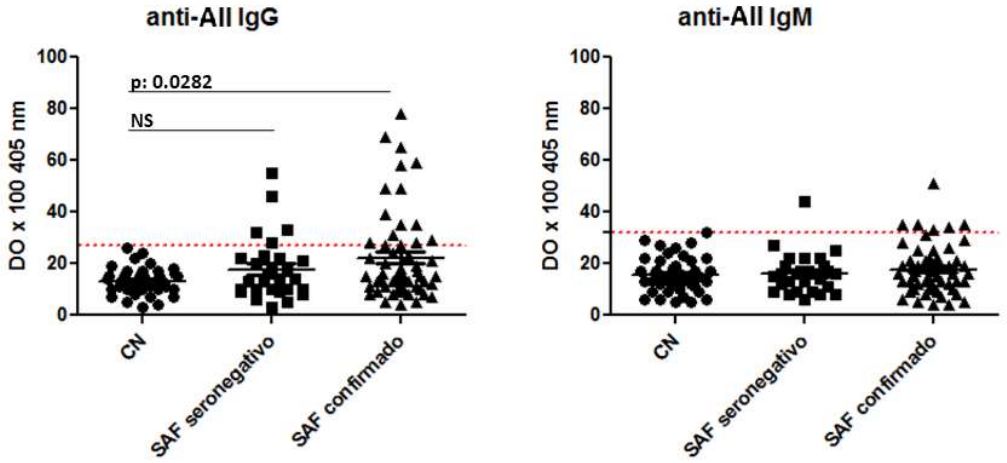


Figura 6

Como se ve, las medias en DO de los anti-AII IgG en el grupo SAF seronegativo no son significativamente superiores con respecto a la población CN pero presentan una tendencia. En el caso de la población SAF confirmado esta diferencia si alcanza significancia con respecto a la población CN (P: 0.0282).

DISCUSIÓN

El SAF se caracteriza por trombosis arterial y/o venosa difusa, pérdida recurrente del embarazo y anticuerpos AF persistentemente positivos (Miyakis S, 2006). Los últimos criterios de clasificación para el diagnóstico de SAF son los criterios de Sapporo revisados en 2006 que requieren la presencia de al menos una manifestación clínica y un criterio de laboratorio positivo (Miyakis S, 2006). Tras la aplicación de los criterios de Sapporo, surgió la controversia porque estos criterios identifican un grupo más homogéneo de pacientes con SAF a expensas de excluir a otro, grupo denominado colectivamente como SAF seronegativo (Kaul M, 2007).

El concepto de SAF seronegativo fue introducido por primera vez en 2003 por Hughes y Khamashta (Hughes GR, 2003) para describir pacientes con manifestaciones clínicas altamente sugestivas de SAF pero con anticuerpos AL, aCL y anti-B2GPI persistentemente negativos.

Desde su introducción, el concepto de SAF seronegativo ha generado discusión y polémica en el ámbito científico. Sin embargo, en la práctica clínica, hay al menos dos observaciones que respaldan el concepto. En primer lugar, la clara respuesta terapéutica al tratamiento anticoagulante cuando se toma la decisión clínica de realizar un tratamiento y, en segundo lugar, la significativa historia familiar de SAF y otras afecciones autoinmunes en muchos de estos pacientes, incluido un pequeño número de gemelos

idénticos que presentan resultados discordantes en la positividad de anticuerpos AF (Hughes GVR, 2019).

Se han propuesto algunas situaciones para explicar la presencia del SAF seronegativo, entre ellas:

- que el diagnóstico clínico sea incorrecto.

- que un AF positivo anterior se haya convertido negativo.

- que la sensibilidad de los métodos convencionales sea insuficiente.

- que las pruebas de AF CL excluyan anticuerpos (AF no convencionales).

La evidencia de los últimos años respalda el concepto de realizar la pesquisa de AF no convencionales también denominados "no criterios" (Hughes GVR, 2019).

El SAF obstétrico es la trombofilia más frecuente y tratable asociada a morbilidad del embarazo. El Departamento de Hemostasia y Trombosis del Instituto de Investigaciones Hematológicas, es un centro de referencia nacional para el estudio de las alteraciones de la coagulación y recibe una gran cantidad de consultas por evolución obstétrica adversa. Esto nos ha motivado a realizar estudios que involucran a la coagulación, el embarazo normal y patológico (Hendler M, 2002; Sánchez-Luceros A, 2003a-2003b-2004-2007-2010-2011; Alberto MF, 2009).

En nuestra serie, las pacientes con criterios clínicos (CC) de SAF obstétrico presentaron mayor frecuencia de AF que aquellas con criterios incompletos (CL): SAF CC (54/85) vs SAF CI (12/34) p: 0.007. Esto sugiere que los criterios clínicos establecidos efectivamente seleccionan una población con mayor probabilidad de presentar AF y como consecuencia de puede inferir una relación causal con la presencia de estos anticuerpos. Los antifosfolídos detectados por el ensayo de anticoagulante lúpico (AL) fueron los anticuerpos positivos excluyentes. En este sentido se ha demostrado que el AL es el ensayo de elección para la detección de AF clínicamente relevantes (Bertolaccini ML, 2014) y por lo tanto se constituye en el mejor factor de predicción de complicaciones clínicas (Galli M, 2003; Lockshin MD, 2012; Yelnik CM, 2016). Esta condición tiene su fundamento en las características del ensayo para AL, dado que al no discriminar el tipo de cofactor proteico como lo realizan los ensayos para aCL y anti-β2GPI se puede inferir que presente una sensibilidad superior (Galli M, 2003).

En cuanto a la determinación de AF no convencionales se eligió realizar la pesquisa de anti-PS, anti-PS/PT y anti-Anexina II dado los antecendentes que vinculan estos ensayos con el SAF obstétrico seronegativo (Alessandri C, 2011; Nayfe R, 2013). En nuestra serie (n:31) la determinación de AF no convencionales en el grupo SAF obstétrico seronegativo, permitió identificar una población que representa un 46%, que presentaros ensayos positivos en particular para anti-PS IgM (29%) y anti-AII gG (17%).

Es interesante destacar el hallazgo de los IgM anti-PS en nuestra población. En relación a los anticuerpos dirigidos contra AF con carga negativa, en 2010 durante 13º Congreso Internacional sobre AF (APLA 2010, 13-16 de abril de 2010, Galveston, Texas, EE. UU.) se revisó el valor diagnóstico de estos anticuerpos que involucran aquellos dirigidos contra el ácido fosfatídico, el fosfatidilinositol y la PS (Bertolaccini ML, 2011). Luego de un análisis exhaustivo, basado en la evidencia, se concluyó que: como consecuencia de la variabilidad en los diseños de los estudio, en relación al tipo de pacientes investigados, las diferencias analíticas en las metodologías y reactivos para detectar estos anticuerpos, solo existen incertidumbres en la relevancia diagnóstica de estas pruebas en

SAF. Varios de los estudios analizados demostraron que aCL reaccionaba de manera cruzada con los anticuerpos anti-PS y anti-ácido fosfatídico (Bertolaccini ML, 2014). La mayor parte de AF detectada por estos ensayos estuvo relacionada con la reactividad contra β2GPI. Sin embargo se sugirió la determinación de anti-PS como objetivo de investigación en el contexto de la morbilidad del embarazo (Bertolaccini ML, 2011). En nuestra serie, que es pequeña pero sirve como dato observacional, 29% de las pacientes con SAF obstétrico seronegativo presentaron anti-PS IgM y por lo tanto fue el anticuerpo más prevalente asociado a esta condición. Este hallazgo debería ser confirmado ampliando el número de la población estudiada.

Los anticuerpos anti-PS/PT, claramente fueron negativos. En el desarrollo de la metodología de laboratorio, se procesó en paralelo una placa solo sensibilizada con PS para poder descontar la interacción con este fosfolípido de manera independiente de la PT y de esta manera determinar la naturaleza específica de la interacción con la prototrombina. Por lo tanto el resultado de la interacción de la interacción específica anti-PS/PT se calculó como la diferencia de DO entre las interacciones anti-PS/PT y anti-PS. De manera sorprendente, los resultados con valores negativos fueron numerosos en todas las poblaciones estudiadas (CN, SAF obstétrico confirmado y SAF obstétrico seronegativo), sugiriendo que la interacción prevalente en nuestras poblaciones, se producen en realidad con el fosfolípido PS de manera independiente de la PT.

En relación a los anti-AII su prevalencia ha sido demostrada en mujeres con morbilidad del embarazo (Cesarman-Maus, 2006; Salle V, 2016). En nuestra serie 17% de las pacientes con SAF obstétrico seronegativo presentaros resultados positivos para el isotipo IgG. Al igual que para los anticuerpos anti-PS IgM la confirmación de este hallazgo debería realizarse ampliando el número de pacientes a estudiar.

Las pacientes con morbilidad obstétrica constituyen un grupo vulnerable, que debe ser resguardado de la aplicación de tratamientos de dudosa calidad científica. El uso de nuevos algoritmos de diagnóstico que incluyan nuevos biomarcadores para complementar a los convencionales, podría colaborar a un diagnóstico más preciso y oportuno en pacientes con SAF seronegativo y esta población podría beneficiarse de una decisión terapéutica con una base más racional. Los hallazgos presentados en el presente trabajo, nos permiten inferir que una población importante de pacientes con SAF obstétrico seronegativo presentan pruebas positivas para AF no convencionales, en particular IgM anti-PS e IgG anti-AII y deberán ser confirmados con la continuidad del estudio incluyendo una población mayor de pacientes con dicho diagnóstico.

REFERENCIAS

Alberto MF, Sanchez Luceros A, Meschengieser S, Lazzari MA.B2 Glycoprotein I (B2GPI) containing IGM immune-complexes (B2GPI-IGM IC) in patients with IGM anticardiolipin antibodies (ACL IGM). Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009; Volume 7, (Sup 2) Abstract PP-MO-274.

Alessandri C, Conti F, Pendolino M et al. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. Autoimmun Rev. 2011; 10(10):609-616.

Amengual O, Horita T, Binder W, et al. Comparative analysis of different enzyme immunoassays for assessment of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies. Rheumatol Int. 2014; 34(9):1225-1230.

Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. Autoimmun Rev. 2014; 13(9):917-930.

Cesarman-Maus G, Ríos-Luna NP, Deora AB, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. Blood. 2006; 107(11):4375-4382.

Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. J Thromb Haemost. 2020; 18(11): 2828-2839.

Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. Blood. 2003; 101(5):1827-32.

Hendler M, Alberto MF, Gennari L, et al. Prevalencia de anticuerpos anticardiolipinas isotipo IgA en complicaciones obstétricas del síndrome antifosfolipídico. Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis (Grupo CATH). Buenos Aires. 25-27 de septiembre de 2002. Acta Bioquím Clin Latinoam, 2002, supl 3: 117.

Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. Ann Rheum Dis. 2003; 62(12):1127.

Hughes GRV, Khamashta MA. 'Seronegative antiphospholipid syndrome': an update. Lupus. 2019; 28(3): 273-274.

Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, et al. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies. Arthritis Rheum. 2012; 64(7): 2311-2318.

Kaul M, Erkan D, Sammaritano L et al. Assessment of the 2006 revised antiphospholipid syndrome classification criteria. Ann Rheum Dis. 2007; 66:927-930.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006; 4(2):295-306.

Nayfe R, Uthman I, Aoun J et al. Seronegative antiphospholipid syndrome. Rheumatology. 2013; 52(8):1358-1367.

Salle V, Schmidt J, Smail A, et al. Antibodies directed against annexin A2 and obstetric morbidity. J Reprod Immunol. 2016; 118:50-53.

Sánchez Luceros A (a), Meschengieser S, Casais P, et al. Prevalence of haemostatic and fibrinolytic abnormalities in women with unexplained embryofetal losses and vascular obstetric complications. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XIX Congress and 49th Annual SSC Meeting. Birminghan, Inglaterra. 12-18 de julio 2003. J Thromb Haemost, 2003, (Suppl 1): P0874.

Sánchez-Luceros A (b), Meschengieser SS, Marchese C, et al. Factor VIII and von Willebrand factor changes during normal pregnancy and puerperium. Blood Coagul Fibrinolysis. 2003; 14(7):647-51.

Sánchez-Luceros A, Farías CE, Amaral MM, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. Thromb Haemost. 2004;92(6):1320-1326.

Sánchez-Luceros A, Meschengieser SS, Turdó K, et al. Evaluation of the clinical safety of desmopressin during pregnancy in women with a low plasmatic von Willebrand factor level and bleeding history. Thromb Res. 2007;120(3):387-390.

Sánchez-Luceros A. Embarazo y síndrome antifosfolípidos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamaericana, 2010; suplemento 1: 33.

Sanchez-Luceros A, Woods AI, Meschengieser SS, et al. Low von Willebrand factor (VWF) level is the more frequent finding in a prospective cohort of childbearing women with bleeding history. Journal of Thrombosis and Haemostasis a 2011 International Society on Thrombosis and Haemostasis 9 (Suppl. 2) (2011) 1–970.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot et al. Antiphospholipid syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2018, 11;4: 17103. doi: 10.1038/nrdp.2017.103.

Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. Thromb Res. 2004; 114(5-6):553-558.

Yelnik CM, Laskin CA, Porter TF, et al. Lupus anticoagulant is the main predictor of adverse pregnancy outcomes in aPL-positive patients: validation of PROMISSE study results. Lupus Sci Med. 2016; 12;3(1):e000131. doi: 10.1136/lupus-2015-000131.

ABSTRACT

Prevalence and clinical correlation of unconventional antiphospholipid antibodies in patients with seronegative obstetric antiphospholipid syndrome.

Objectives: to determine the prevalence of unconventional antiphospholipid (AP) antibodies, anti-phosphatidylserine (anti-PS IgG, IgM), anti-phosphatidylserine-prothrombin (anti PS/PT IgG, IgM) and anti-Anexin II (anti-AII IgG, IgM) in a group of women with clinical criteria for seronegative obstetric antiphospholipid syndrome (APS).

Methods: 159 women were studied, 85 with clinical criteria (CC) for obstetric APS, 34 with incomplete criteria (IC) for obstetric APS, and 40 without obstetric morbidity (NC). AP laboratory criteria (AP LC) for APS were determined in all of them: lupus anticoagulant (LA), anticardiolipins (IgG, IgM), anti-beta 2 glycoprotein 1 (IgG, IgM). Non-conventional APs were detected using the ELISA technique developed in the laboratory, taking values above the 99% percentile obtained with NCs as cut-off points.

Results: 64% (54/85) and 36% (31/85) of the patients in the CC group presented positive and negative AP LC, respectively. These results allowed them to be categorized into two groups: confirmed APS and seronegative APS. In the group with IC, 35% (12/34) and 65% (22/34) of the patients presented positive and negative AP LC, respectively. The prevalence of positive AP LC was higher in the CC vs IC group ($p<0.0076$). LA was the most prevalent AP LC in the APS group (96% positive AL). In the seronegative APS group, 17% (5/31) and 3% (1/31) of the patients were positive for anti-AII IgG and IgM respectively; 3% (1/31) and 29% (9/31) for anti-PS IgG and IgM respectively and 3% (1/31) and 3% (1/31) for anti-PS/PT IgG and IgM respectively. These proportions were not significantly different from those found in the confirmed APS group, and in both groups the presence of unconventional AP was associated with similar rates of both recurrent miscarriage and stillbirth.

Conclusions: in our series, patients with clinical criteria of obstetric APS presented a higher frequency of AP LC, however around 40% remained seronegative. The inclusion of non-conventional AP determination in the seronegative group, particularly IgM anti-PS and IgG anti-AII, allowed the identification of an additional positive population of around 46%. The prevalent unconventional AP was IgM anti-PS. This population could benefit from a more rationally based therapeutic decision. Although the findings presented allow us to infer a participation of non-conventional APs in patients with clinical criteria for obstetric APS, they must be confirmed with the continuation of the study.

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES GENÓMICAS DE *PD-L1*/*PD-L2* EN PACIENTES CON LINFOMA DE HODGKIN. VALOR PRONÓSTICO Y SIGNIFICADO CLÍNICO

Irma Slavutsky, Mauro García Montenegro, Marina Narbaitz,
María Fernanda Metrebian, Astrid Pavlovsky

Instituto de Medicina Experimental.
CONICET - Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

El linfoma de Hodgkin (LH) es un proceso linfoproliferativo clonal originado en las células B del centro germinal, potencialmente curable. Es uno de los linfomas más frecuentes en el mundo occidental, con una incidencia de 2,4 casos por cada 100.000 individuos (1). Afecta con mayor frecuencia a adultos jóvenes, representando aproximadamente el 10% del total de linfomas recién diagnosticados y el 21% en edad adolescente (2). Tiene una tasa de supervivencia aproximada de 92% al año, 85% a los 5 años y 80% a los 10 años del diagnóstico (3). Se caracteriza por presentar escasas células neoplásicas, denominadas células de Reed Sternberg/Hodgkin (RS/H) (1-2% de la masa tumoral) inmersas en un importante microambiente tumoral rico en células inflamatorias pertenecientes al sistema inmune. Desde el punto de vista morfológico, comprende dos entidades, el LH clásico (LHC) (95% de los casos) y el LH predominio linfocítico nodular. A su vez el LHC se subdivide en cuatro subtipos histológicos: esclerosis nodular, celularidad mixta, rico en linfocitos y depleción linfocitaria (4, 5). Al presente, su estudio resulta de gran interés debido a su variabilidad clínica, su complejidad histológica, su heterogeneidad genética y la particular desregulación de múltiples vías de señalización (6).

Diferentes estudios relacionados al microambiente tumoral en LHC han descripto múltiples mecanismos celulares y moleculares, que muestran la capacidad de las células de RS/H de producir moléculas que limitan la eficiencia de la inmunidad innata y adaptativa mediada por linfocitos T, entre los cuales resulta de importancia la activación de la vía coinhibitoria PD-1/PD-L1/2 (7). Particularmente, PD-1 (*Programmed death 1*) es una molécula de señalización de la superficie celular que se expresa en linfocitos T activados, así como en otras células efectoras del sistema inmune. En condiciones fisiológicas y mediante la interacción con sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, envía una señal inhibitoria que regula el balance entre la activación de células T y la tolerancia inmunológica, permitiendo controlar la intensidad y duración de la respuesta inmune para limitar el daño tisular frente a determinados antígenos, evitando el desarrollo de enfermedades autoinmunes y alérgicas. Consecuentemente, la estimulación de la vía de señalización PD-1 genera un fenómeno de agotamiento de las células T efectoras (células T "exhaustas"), resultando en la inhibición temporaria y reversible de su activación, así como limitando su diferenciación y expansión clonal (8-11). Por su parte, PD-L1 y PD-L2 son proteínas de transmembrana tipo 1 que se encuentran codificadas por los genes

CD274 (*CD274 Molecule*) y *PDCD1LG2* (*Programmed Cell Death 1 Ligand 2*), respectivamente, encontrándose constitutivamente expresadas en células que participan de la homeostasis del sistema inmune (9). Diferentes estudios han reportado altos niveles de expresión de PD-L1 tanto en tumores sólidos (12-15) como en neoplasias hematológicas (10, 16-18). Ambos genes presentan 7 exones cada uno y se encuentran ubicados en el brazo corto del cromosoma 9, a nivel de 9p24.1, a 300Kb rio abajo del gen *JAK2* (*Janus Kinase 2*) y separados entre sí por 42Kb. Este último gen codifica una proteína tirosina kinasa que media la activación de receptores de citosinas involucrados en mecanismos de inflamación e inmunidad (10).

A nivel genético, las células de RS/H se caracterizan por presentar un gran número de aberraciones cromosómicas complejas y poco recurrentes, lo que refleja su marcada inestabilidad genómica (19-21). Reportes recientes de la literatura, describen que la amplificación del locus 9p24.1 en células de RS/H es una anomalía altamente recurrente, tanto en líneas celulares como en tumores primarios, resultando en un incremento de la expresión proteica de PD-L1 y PD-L2 (10, 22), con la consecuente capacidad de modular el microambiente tumoral inflamatorio para favorecer el escape al sistema inmune antitumoral. Simultáneamente, existe escasa evidencia de alteraciones cromosómicas en células del microambiente tumoral (23, 24), siendo de interés efectuar su evaluación. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar los desbalances genómicos a nivel del locus 9p24.1 en biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina de pacientes con LHC, tanto en las células RS/H como en las del microambiente tumoral, y correlacionarlo con el nivel de expresión proteica y las características clínicas de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes estudiados.

Se evaluaron en forma retrospectiva 28 biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina de pacientes con LHC al diagnóstico sin tratamiento previo, con serología negativa para el virus de la inmunodeficiencia humana (11 varones; edad media 31 años, rango: 18-54 años; estadios I/II: 40% y estadios III/IV: 60%). Los pacientes forman parte del estudio GATLA LH05 de LH de Argentina (25). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

Análisis histopatológico e inmunohistoquímico.

Se efectuó el estudio de cortes histológicos (3-5 μm) con tinción de hematoxilina-eosina (H&E) previa desparafinización y rehidratación del tejido según protocolo, complementado con técnica de inmunohistoquímica (IHQ) con recuperación antigénica inducida por calor en baño termostatizado a 95ºC durante 30 min en buffer Tris-EDTA pH 9 seguido de incubación con el anticuerpo primario over-night. Se empleó el sistema de revelado streptavidin-biotin (Cell Marque, CA, USA) y el sistema de detección con cromógeno 3.3'-Diaminobenzidine (Dako, St Louis, USA). Se utilizaron los siguientes anticuerpos anti: CD20, CD3, CD30 (Dako, St Louis, USA), CD15 (Becton Dickinson, CA, USA) y Pax5 (Cell Marque, CA, USA). Además, se efectuó inmunomarcación con el anticuerpo anti-PD-L1/CD274 (clon RBT-PDL1, Rmab, BioSB) para determinar el nivel de expresión proteica en células de RS/H, considerando grado +3 el máximo nivel, seguido por +2, +1 y 0 como ausencia de expresión (Figura 1)

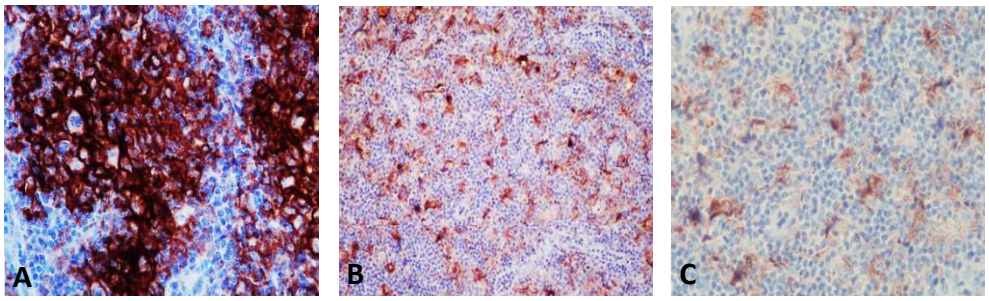


Figura 1: Inmunomarcación de células de Reed Sternberg/Hodgkin con el anticuerpo anti-PDL1 (clon RBT-PDL1, Rmab, BioSB) mostrando: A) Score +3; B) Score +2; C) Score +1.

FISH (*Fluorescence in situ hybridization*).

Se efectuó el análisis por FISH del clúster PD-L1/PD-L2 (9p24.1). El estudio se realizó sobre cortes histológicos de 3-5 µm de espesor en portaobjetos silanizados. Previamente se seleccionó la muestra a hibridar mediante microscopía óptica, revisando los preparados histológicos teñidos con H&E y anti-CD30, eligiendo aquellos que presentaron al menos 50 células de RS/H en un mismo corte. Se procedió a desparafinizar e hidratar los cortes mediante pasajes sucesivos por xilol y etanol. Luego se efectuó pre-tratamiento en buffer Tris-EDTA pH 9 en baño termostatizado a 95ºC durante 30 min y posterior lavado con dos pasajes en agua destilada y PBS 1X 5 min final, seguido de deshidratación en una serie creciente de etanol y secado al aire. Se procedió a la digestión enzimática con Pepsina, 20 min en baño termostatizado a 37-40°C. Posteriormente se realizó hibridación e incubación automatizada en Hybrite (Vysis, USA) empleando la sonda SPEC CD274/PDCD1LG2/CEN9 (ZytoVision, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente se realizaron los lavados astringentes post-hibridación y se contracoloreó con DAPI *(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride).* Se efectuó la observación en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Olympus BX60 empleando el software *Cytovision Applied Imaging* (Leika, Alemania).

En cada caso se determinó el número de copias del locus PD-L1/PD-L2 en relación al centrómero del cromosoma 9 en 50 células de RS/H, sobre cortes de tejido completo, clasificando las alteraciones genómicas como amplificación (A) cuando había ≥3 copias del gen en estudio respecto al número de señales centroméricas (ratio ≥3:1), ganancia (G) cuando el ratio era <3:1 pero >1:1 y polisomía (P) cuando el ratio era 1:1 (Figura 2). Además, se evaluaron 3 casos de linfadenitis reactivas, a fin de determinar el punto de corte para la detección de monosomía del cromosoma 9 en células del microambiente tumoral (media +3 desvíos estándar: 20%).

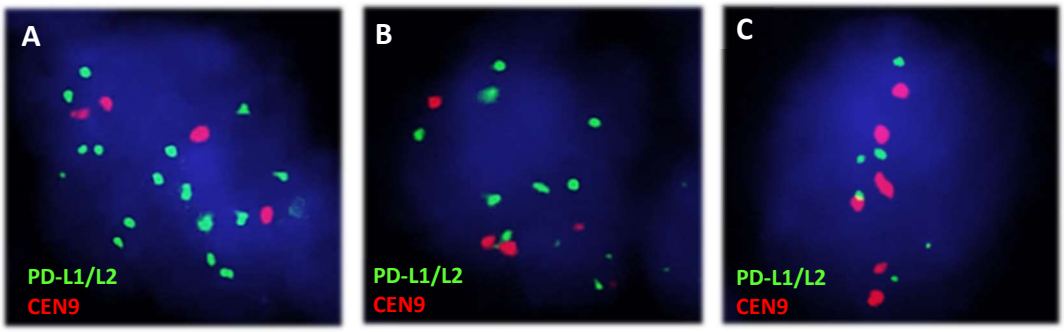


Figura 2: Células de Reed Sternberg/Hodgkin de pacientes con linfoma de Hodgkin clásico hibridadas con la sonda SPEC CD274/PDCD1LG2/CEN9 (locus 9p24.1: verde, centrómero del cromosoma 9: rojo) (ZytoVision, Alemania) mostrando: A) Amplificación del locus 9p24.1; B) Ganancia; C) Polisomía.

Análisis estadístico.

La comparación de los datos de los pacientes se efectuó empleando programa IBM SPSS Statistisc 24. Para el análisis de las variables clínicas y de laboratorio se utilizó el test `t´ de Student (para variables cuantitativas) y la prueba de Chi cuadrado o el Test Exacto de Fisher (para variables categóricas). Para todas las evaluaciones se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$.

RESULTADOS

El análisis por FISH de las células de RS/H mostró alteraciones en el número de copias del locus PD-L1/PD-L2 en la totalidad de los pacientes estudiados, con porcentajes variables de A, G y P. Esto permitió diferenciar dos grupos citomoleculares: uno con presencia de los tres tipos de alteraciones (Grupo AGP) (9; 32%) y otro sin amplificación (Grupo GP) (19; 68%). No se encontró ningún caso que presentara un solo tipo de alteración. A su vez, dentro del grupo GP se observó que el 52,6% de los pacientes (10/19) tenían >50% de células de RS/H con G (subgrupo GP-G; GP rico en ganancias), en tanto que el 47,4% (9/19) restante presentó mayor porcentaje de polisomías (≤50% de células RS/H con G; subgrupo GP-P; GP rico polisomías) (Figura 3).

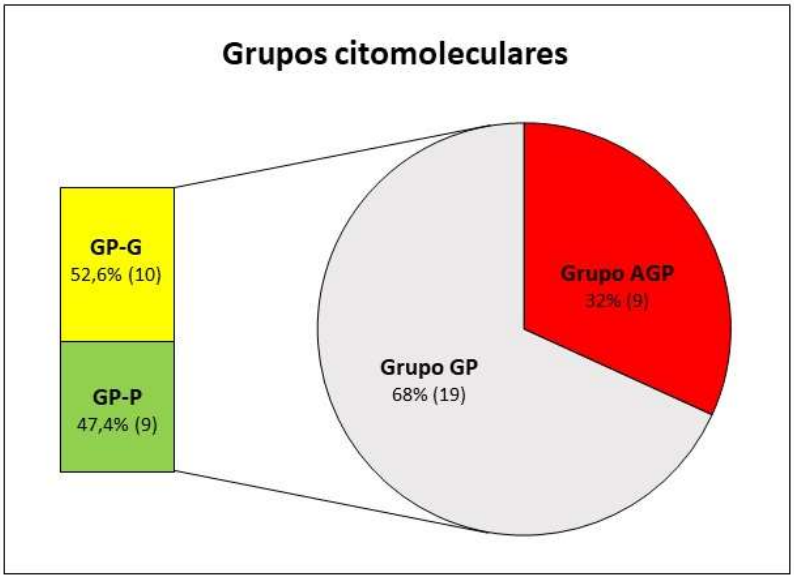


Figura 3: Gráfico mostrando la distribución de los grupos citomoleculares. Grupo AGP con amplificación de 9p24.1; Grupo GP sin amplificación de 9p24.1; Grupo GP-G rico en ganancias (>50% de las células con G); Grupo GP-P rico en polisomías (≤50% de las células con G). A: amplificación; G: ganancia; P: polisomía.

A nivel proteico, el 96,4% de los casos (27/28) mostraron expresión de intensidad variable para PD-L1 en las células de RS/H. Cuando efectuamos el análisis por grupo, pudimos observar que los pacientes de los grupos GP-P y GP-G tenían menor nivel de expresión, con score +1 en el 66,7% (6/9) y en el 60% (6/10) de los casos, respectivamente, en tanto que el score +3 se visualizó particularmente en el grupo AGP (6/9; 66,7%) y en un paciente del subgrupo GP-G (1/10; 10%). No se observaron casos con mínima o nula expresión en el grupo AGP (Figura 4), indicando una asociación positiva entre el número de copias del locus PD-L1/PD-L2 y el nivel de expresión proteica.

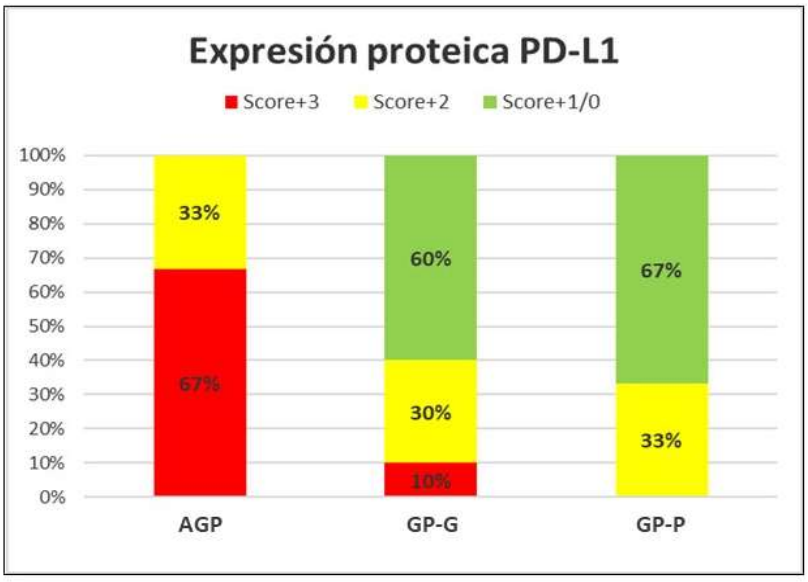


Figura 4: Gráfico mostrando los niveles de expresión proteica de PD-L1 según grupo citomolecular. Grupo AGP con amplificación de 9p24.1; Grupo GP sin amplificación de 9p24.1; Grupo GP-G rico en ganancias (>50% de las células con G); Grupo GP-P rico en polisomías (≤50% de las células con G). A: amplificación; G: ganancia; P: polisomía.

En cuanto al análisis de las características clínicas, resulta interesante destacar que los pacientes del grupo AGP mostraron una edad media significativamente menor al inicio de la enfermedad (25,3 años) respecto el grupo GP (34,9 años (p=0,031). Cuando este último grupo lo dividimos en los dos subgrupos previamente mencionados, se observó que el grupo GP-G presenta una media de edad menor (32 años) que el GP-P (38,2 años). Asimismo, observamos ausencia de masa Bulky mediastinal en los pacientes del grupo GP-P, manifestación presente en los casos AGP y GP-G (7/19; 36,8%), indicando un comportamiento más agresivo de la enfermedad. En relación al análisis del PET (*positron emission tomography*) efectuado a los tres meses del inicio el tratamiento quimioterápico (PET3), resultó positivo (Deauville score 3-4-5) (26) en el 55,6% (5/9) de los casos con amplificación, respecto del 26,3% (5/19) de los pacientes sin amplificación. No se observaron diferencias en los restantes parámetros clínicos analizados.

Por otra parte, en 21 pacientes se efectuó el análisis de los linfocitos T pequeños del microambiente tumoral circundantes a las células RS/H, observándose monosomía del cromosoma 9 en 12 casos (57%) (Figura 4a). Resulta interesante destacar que esta alteración se encontró particularmente asociada al grupo GP-P (100% de los casos) respecto del grupo AGP (33,3%) y GP-G (44,4%) (Figura 5b), sugiriendo una mayor inestabilidad genómica en las células del microambiente tumoral de los casos ricos en polisomías.

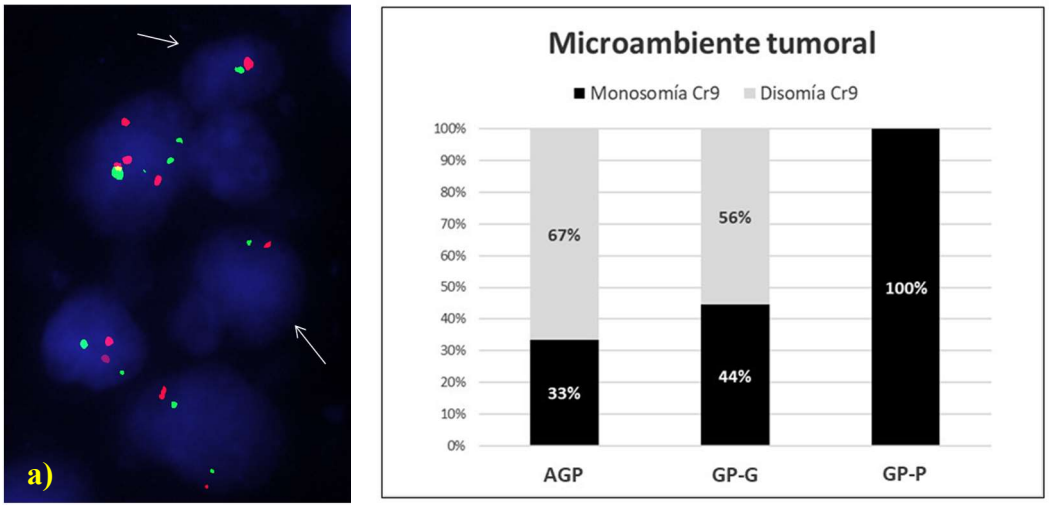


Figura 5: a) Núcleos interfásicos hibridados con la sonda SPEC CD274/PDCD1LG2/CEN9 (locus 9p24.1: verde, Centrómero del cromosoma 9: rojo) (ZytoVision, Alemania) mostrando linfocitos con monosomía del cromosoma 9 (flechas). b) Gráfico mostrando la distribución de la monosomía del cromosoma 9 en los distintos subgrupos citomoleculares. Cr9: cromosoma 9; Grupo AGP con amplificación de 9p24.1; Grupo GP-G rico en ganancias (>50% de las células con G); Grupo GP-P rico en polisomías (≤50% de las células con G). A: amplificación; G: ganancia; P: polisomía.

DISCUSIÓN

El análisis de nuestros datos mostró desbalances genómicos, fundamentalmente ganancia del número de copias o amplificación del locus 9p24.1, en las células de RS/H de todos los casos estudiados. Este valor resulta similar al detectado por Roemer et al (22) (92%), en tanto que contrasta con los resultados de estudios realizados empleando CGH (*Comparative genomic hybridization*) en células de RS/H aisladas por microdisección

láser, que presentaron aumento del número de copias para dicho locus en el 40% de los casos (19, 20).

Asimismo, la evaluación de nuestros datos permitió distinguir claramente la presencia de dos grupos de pacientes: con y sin amplificación de 9p24.1. Los casos sin amplificación fueron a su vez subdivididos en otros dos subgrupos de acuerdo a la proporción de células de RS/H con ganancias para dicho locus: GP-G y GP-P. Nuestra serie presentó amplificación del locus 9p24.1 en el 32% de los casos, sustentando datos previos de la literatura que detectan esta alteración en el 36%-38% de los pacientes evaluados (10, 22). Por el contrario, no encontramos casos puramente polisómicos ni sin alteraciones numéricas del locus 9p24.1, los cuales sí fueron detectados, aunque en baja frecuencia, en la literatura (5% y 1%, respectivamente) (22).

Resulta interesante destacar que el grupo de pacientes con amplificación junto a aquellos con ganancias ≥50% del locus 9p24.1 presentaron una edad media significativamente menor que los pertenecientes al subgrupo GP-P. A nuestro conocimiento no hay referencias previas al respecto, siendo necesarios estudios en series más largas a fin de confirmar este hallazgo. Simultáneamente, los grupos AGP y GP-G mostraron asociación con la presencia de masa Bulky, relacionada a enfermedad progresiva, aspecto no detectado en los pacientes GP-P y que sustentaría el probable valor pronóstico de la amplificación de 9p24.1 en LHC. No obstante, la literatura muestra datos contradictorios. Roemer et al (22) observaron una menor sobrevida libre de progresión (SLP) y estadios más avanzados al debut de la enfermedad en los casos con amplificación del locus PD-L1/PD-L2, en tanto que Paydas et al (27) describieron peor SLP y sobrevida global (SV) en casos de LHC con coexpresión de PD-L1 y PD-1 en células tumorales y del microambiente tumoral. Por el contrario, otros autores no encontraron diferencias en la SLP y SV entre los casos con alta y baja expresión de PD-L1/PD-L2 en células de RS/H (28, 29) mientras que Hollander et al (30) observa menor SLP en los casos con alta expresión de PD-L1 y PD-1 en células del microambiente tumoral y no en células de RS/H, siendo de importancia continuar estos estudios a fin de definir el significado clínico de esta alteración en el LHC.

Simultáneamente, el análisis por IHQ en células de RS/H mostró asociación positiva entre el número de copias del locus PD-L1/PD-L2 con el nivel de expresión proteica de PD-L1. Esta asociación fue demostrada inicialmente por Green et al (10) quienes también observaron el aumento de expresión de *JAK2* (*Janus Kinase 2*). Esto resulta de importancia ya que la amplificación del locus 9p24.1 no solo implica modificaciones en el número de copias de *PD-L1* y *PD-L2*, sino también del gen *JAK2*, con la consecuente activación de la vía de señalización JAK/STAT, que a su vez induce aún más la expresión de los ligandos de PD-1 y profundiza la activación del eje PD-1/PD-L1/2, estimulando la proliferación neoplásica (10, 16).

Por otra parte, diferentes estudios mostraron la presencia de aberraciones cromosómicas, particularmente alteraciones numéricas, en células linfoides morfológicamente normales del microambiente tumoral, localizadas en la proximidad de las células neoplásicas (23, 24). En nuestra serie, observamos monosomía del cromosoma 9 en las células del microambiente tumoral circundantes a las células RS/H en el 57% de los casos, particularmente asociado al grupo GP-P. Este hallazgo sustentaría la inestabilidad cromosómica descripta en pacientes con LH, manifestada por la presencia de rearreglos cromosómicos complejos en las células de RS/H y aneuploidías tanto en las células neoplásicas como en los linfocitos aparentemente normales del microambiente tumoral (16, 31, 32) así como también por estudios en linfocitos de sangre periférica de pacientes con LHC pre y post-tratamiento (32-34) y análisis de micronúcleos y disfunción

telomérica (21). El empleo de metodologías más recientes como CGH y NGS (*Next generation sequencing*) también muestra una alta inestabilidad cromosómica en estos pacientes (19, 20, 35).

Concluyendo, nuestros resultados muestran que los desbalances genómicos del locus PD-L1/PD-L2 son altamente frecuentes en el LHC, presentándose con un espectro de alteraciones numéricas específico que permitió diferenciar claramente dos grupos. Los casos con amplificación de 9p24.1 mostraron una menor edad al inicio de la enfermedad, masa Bulky mediastinal al diagnóstico, aumento significativo de la expresión proteica de PD-L1 y menor inestabilidad genómica en las células del microambiente tumoral. Estos hallazgos constituyen un aporte a la caracterización biológica del LHC y resultan de interés en el marco de las nuevas modalidades terapéuticas con inmunomoduladores aplicadas en pacientes con LHC recaído/refractario (36, 37) que demostraron que el bloqueo de esta vía de señalización inhibitoria de linfocitos T efectores, se asocia a una mejor tasa de respuesta al tratamiento y de SLP, alcanzando una alta eficacia terapéutica.

RESUMEN

El linfoma de Hodgkin clásico (LHC) es un proceso linfoproliferativo clonal caracterizado por presentar escasas células de Reed Sternberg/Hodgkin (RS/H) inmersas en un destacado microambiente tumoral. Afecta con mayor frecuencia a adultos jóvenes, representando aproximadamente el 10% del total de linfomas recién diagnosticados. Actualmente se sabe que las células de RS/H producen moléculas que limitan la eficacia de la inmunidad celular mediada por linfocitos T, destacándose alteraciones a nivel de la vía de señalización de PD-1 (*programmed death-1*) y sus ligandos *CD274 (PD-L1) y PDCD1LG2 (PD-L2)*, que mapean a nivel de 9p24.1. La estimulación de esta vía de señalización genera un fenómeno de agotamiento de las células T efectoras (células T "exhaustas"), resultando en la inhibición temporaria y reversible de su activación, que favorecería al desarrollo neoplásico. Las células de RS/H se caracterizan por presentar un gran número de aberraciones cromosómicas complejas que reflejan su marcada inestabilidad genómica. Entre ellas, las alteraciones a nivel del locus 9p24.1 determinan un desbalance en el número de copias de los genes *PD-L1* y *PD-L2*. Simultáneamente, existen escasas evidencias de alteraciones cromosómicas en células del microambiente tumoral. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar los desbalances genómicos en el locus 9p24.1 en biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina de pacientes con LHC y correlacionarlo con el nivel de expresión proteica y las características clínicas de los pacientes. Se evaluaron en forma retrospectiva biopsias de 28 pacientes con LHC pertenecientes al estudio GATLA LH05 de LH de Argentina. Se efectuó técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) empleando la sonda SPEC CD274/PDCD1LG2/CEN9 (9p24.1). Para cada paciente se analizaron 50 células de RS/H y 100 del microambiente tumoral. Acorde al número de copias, las alteraciones se clasificaron como: amplificación (A) (3 o más), ganancia (G) y polisomía (P). Se evaluó el nivel de expresión proteica de PD-L1 con el anticuerpo anti-PD-L1/CD274. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado. En todos los casos se observaron alteraciones en el número de copias del locus PD-L1/PD-L2. Se diferenciaron dos grupos: con amplificación (AGP; 9; 32%) y sin amplificación (GP; 19; 68%). Este último fue subdividido en dos subgrupos: GP con más del 50% de células con G (GP-G; 52,6%) y GP rico en polisomías (GP-P; 47,4%). La expresión proteica mostró score +3 casi exclusivamente en los casos con amplificación, identificándose un caso en

el grupo GP-G y ninguno en el grupo GP-P. Los pacientes AGP mostraron al diagnóstico edad significativamente menor (25,3 años) que los del grupo GP (34,9 años) (p=0,031). Los casos GP-P no presentaron masa Bulky, observada en el 36,8% de los pacientes AGP/GP-G. El PET (*positron emission tomography*) efectuado a los tres meses del inicio del tratamiento resultó positivo en el 55,6% de los casos con amplificación, respecto del 26,3% de los restantes pacientes. No se observaron diferencias en los restantes parámetros clínicos analizados. Asimismo, se observó monosomía del cromosoma 9 en los linfocitos T pequeños del microambiente tumoral en el 100% de los casos GP-P P respecto del 36,4% de los pacientes AGP/GP-G. Estos hallazgos constituyen un aporte a la caracterización biológica del LHC y resultan de interés en el marco de las nuevas modalidades terapéuticas con inmunomoduladores aplicadas en pacientes con LHC recaído/refractario.

ABSTRACT

Classical Hodgkin lymphoma (CHL) is characterized by rare tumor Reed-Sternberg/ Hodgkin (RS/H) cells surrounded by a dense immune microenvironment. Genetic alterations at 9p24.1 locus result in constitutive activation of both PD-L1 and PD-L2 genes, inducing PD-1 signaling and T-cell exhaustion. Simultaneously, there is scarce information about genomic imbalances of this locus in tumor microenvironment (TM) cells. We have characterized genomic imbalances at the 9p24.1 locus by FISH on paraffin embedded biopsies of CHL patients, in both RS/H and TM cells. Results were correlated with PD-L1 protein expression and clinical characteristics. Twenty-eight newly diagnosed patients with CHL were evaluated. For FISH analysis, the SPEC CD274/PDCD1LG2/CEN9 probe (9p24.1) was used. The frequency and of 9p24.1 alterations - polysomy (P), copy gain (G), and amplification (A) - were determined. For protein expression, anti-PD-L1/CD274 antibody was used. The study was approved by the Institutional Ethics Committee. All cases showed PD-L1/PD-L2 copy number alterations. According FISH, patients were divided in: AGP group (32%) and GP group (without A) (68%). Within the GP group, 52.6% of cases were rich in G (GP-G subgroup), while the remaining 47.4% were rich in P (GP-P subgroup). Almost all cases (27/28) showed PD-L1 expression. Most of cases with protein expression score +3 belonged to AGP group. The AGP group showed a significant lower mean age at diagnosis than the GP group (p=0.031). Mediastinal bulky disease was absent in the GP-P subgroup. PET scan at 3 months was positive in 55.6% of cases with A compared to 26.3% patients without A. No differences in other clinical parameters were observed. The analysis of TM cells showed chromosome 9 monosomy in 100% of evaluated cases from the GP-P subgroup compared to 36.4% of AGP/GP-G patients. Our findings contribute to the biological characterization of CHL being of interest in the context of new immunomodulatory therapies.

REFERENCIAS

1. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. Blood 2010; 116: 3724-34.

2. Siegel RL Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69: 7-34.

3. Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin Lymphoma: A review and update on recent progress. CA Cancer J Clin 2018; 68: 116-32.

4. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 2016; 127: 2375-90.

5. Jaffe ES, Stein H, Swerdlow SH. Classic Hodgkin lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon, France. IARC Press, 2017. p. 435-42.

6. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. Clin Lymph Res 2009; 9: 206-16.

7. Calabretta E, d'Amore F, Carlo-Stella C. Immune and inflammatory cells of the tumor microenvironment represent novel therapeutic targets in classical Hodgkin lymphoma. Int J Mol Sci 2019; 20: 5503.

8. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD 1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med 2000; 192: 1027-34.

9. Keir M, Butte M, Freeman G, Sharpe AH. PD-1 and its ligand in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008; 26: 677-704.

10. Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood 2010; 116: 3268-77.

11. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. Annu Rev Immunol 2016; 34: 539-73.

12. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. Clin Cancer Res 2004; 10: 5094-100.

13. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Co-stimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma subjects: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 17174-9.

14. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. Clin Cancer Res 2005; 11: 2947-53.

15. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer 2010; 116: 1757-66.

16. Van Roosbroeck K, Finalet Ferreiro J, Tousseyn T, et al. Genomic Alterations of the JAK2 and PDL Loci Occur in a Broad Spectrum of Lymphoid Malignancies. Genes Chrom Cancer 2016; 55:428-41.

17. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. Blood 2016; 127: 869-81.

18. Cheng Z, Dai Y, Wang J, Shi J, Ke X, Fu L. High PD-L1 expression predicts poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Ann Hematol 2018; 97:1085-8.

19. Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, et al. Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. Haematologica 2008; 93: 1318-26.

20. Steidl C, Telenius A, Shah SP, et al. Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies

21. Cuceu C, Hempel WM, Sabatier L, Bosq J, Carde P, M'Kacher R. Chromosomal instability in Hodgkin lymphoma: An in-depth review and perspectives. Cancers 2018; 10: 91.

22. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. J Clin Oncol 2016; 34: 2690-7.

23. Erdkamp FL, Schouten HC, Breed WP, et al. DNA aneuploidy in Hodgkin's disease: a multiparameter flow cytometric analysis. Leuk Lymphoma. 1994; 12: 297-306.

24. Jansen MP, Hopman AH, Haesevoets AM, et al. Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease are not restricted to Hodgkin/Reed-Sternberg cells. J Pathol 1998; 185: 145-52.

25. Pavlovsky A, Fernandez I, Kurgansky N, et al. PET-adapted therapy after three cycles of ABVD for all stages of Hodgkin lymphoma: results of the GATLA LH-05 trial. Br J Haematol 2019; 185: 865-73.

26. Meignan M, Gallamini A, Haioun C. Report on the first international workshop on interim-PET-scan in lymphoma. Leuk Lymphoma 2009; 50: 1257-60.

27. Paydas S, Bagır E, Seydaoglu G, Ercolak V, Ergin M. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. Ann Hematol 2015; 94: 1545-52.

28. Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofer S, Tzankov A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. Hum Pathol 2016; 54: 17-24.

29. Koh YW, Jeon YK, Yoon DH, Suh C, Huh J. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma. Tumour Biol 2016 37: 7507-14.

30. Hollander P, Kamper P, Ekstrom Smedby K, et al. High proportions of PD-1 $^{+}$ and PD-L1 $^{+}$ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. Blood Adv 2017; 1: 1427-39.

31. Falzetti D, Crescenzi B, Matteuci C, et al. Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. Haematologica 1999; 84: 298-305.

32. M'Kacher R, Girinsky T, Koscielny S, et al. Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients. Int J Radiat. Oncol Biol Phys 2003; 57: 321-6.

33. Barrios L, Caballin MR, Miro R, et al. Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from untreated Hodgkin's patients. A possible evidence for chromosome instability. Hum Genet 1988; 78: 320-4.

34. Salas C, Niembro A, Lozano V, et al. Persistent genomic instability in peripheral blood lymphocytes from Hodgkin lymphoma survivors. Environ Mol Mutagen 2012; 53: 271-80.

35. Mata E, Díaz-López A, Martín-Moreno AM, et al. Analysis of the mutational landscape of classic Hodgkin lymphoma identifies disease heterogeneity and potential therapeutic targets. Oncotarget 2017; 8: 111386-95.

36. Younes A, Santoro A, Shipp M, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. The Lancet Oncol 2016; 17: 1283-94.

37. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 2015; 372: 311-9.

DETERIORO COGNITIVO LEVE, RIESGO CARDIOVASCULAR Y BIOMARCADORES ASOCIADOS EN ADULTOS MAYORES DE UN ZONA RURAL DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN

Analía Graciela Soria de González, Liliana Mónica Tefaha, Rosa Silvina Guber, Adriana Liatto de Nogalo, Roxana Toledo, Félix Fernando Aragón, Jorge Gustavo José, Noemí Graciela Sandoval, Gustavo Vázquez Paez, Demetrio Mateo Martínez, Chabán Maha, Ivana Mercedes Garay

Laboratorio de Patología Molecular (LAPAM). Cátedra de Patología Molecular. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Hospital Centro de Salud "Zenón Santillán". Unidad de Práctica Final Obligatoria. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán

INTRODUCCIÓN

La demencia (Dm) es considerada como un síndrome cuya etiología principal es la enfermedad de Alzheimer (EA), seguida en frecuencia de la enfermedad vasculoencefálica. En el 2006, la prevalencia mundial de Dm tipo Alzhaimer era de 26,6 millones de personas y se predice su cuadruplicación para el 2050, debido a diferentes cambios en modos de vida de la población. En Argentina la prevalencia estimada es de 12% y continúa en incremento. Cabe destacar que varios autores señalan la importancia de la detección temprana del deterioro cognitivo leve (DCL) debido a que se sabe que este síndrome inicial, puede incrementar hasta 6 veces la progresión a Dm. Según un estudio publicado en el Cardiovascular Health Study Cognition Study la prevalencia del DCL fue de 22% en individuos mayores a 75 años y los factores de riesgo detectados fueron un score bajo en el "Mini-Mental Test", bajo nivel educacional, presencia de hipertensión arterial (HTA) y/o depresión. Las Naciones Unidas ubican a Argentina entre los tres países más envejecidos de América Latina junto a Cuba y Uruguay. Este envejecimiento demográfico resulta en mayor expectativa de vida que, en Argentina, alcanza actualmente los 75,7 años. Existe suficiente información respecto al hecho que los factores de riesgo podrían comportarse como nexo entre daño vascular y compromiso funcional del cerebro. Existen claros mecanismos que vinculan HTA y enfermedad cognitiva. La HTA daña las arterias cerebrales provocando alteraciones funcionales y estructurales. Estas lesiones son detectadas en 20% de pacientes con EA y en 10% de aquellos con DCL. El estudio Syst-Eur comprobó que reduciendo en 8 mm Hg la presión arterial sistólica y en 4 mm la diastólica, se produce una disminución en la incidencia de demencia del 55% anual, situación que demuestra la elevada importancia de la detección e intervención temprana en estas patologías para evitar o enlentecer su curso evolutivo en la edad adulta. La Dm tipo vascular y el tipo Alzheimer, son las formas etiológicas más frecuentes representando el 85% de los casos (15% la forma vascular y 70% la forma degenerativa). La HTA crónica es el factor de riesgo modificable de mayor prevalencia que daña las arterias cerebrales. Su adecuado control en etapas tempranas de la vida redituará en beneficios tardíos,

disminuyendo el riesgo de accidente cerebrovascular, DCL y Dm. Además de lo anteriormente citado, se debe investigar la interacción con otros factores de riesgo cardiovascular (FRCV) como la hipertrigliceridemia, el LDL-colesterol, tabaquismo, diabetes, obesidad. En el momento actual no existen tratamientos capaces de curar estas enfermedades y los fármacos existentes, de alto costo, son tratamientos sintomáticos, útiles solamente para enlentecer el curso progresivo de la enfermedad y controlar parcialmente los signos de DCL, conductual y posiblemente funcional. Por ello, cualquier esfuerzo relacionado con la prevención de estas enfermedades, tiene gran interés. En situaciones patológicas, algunas proteínas son reguladas negativa o positivamente, según la función específica de la misma, sufriendo modificaciones post-traduccional. Estos cambios en el perfil de las proteínas podrían conducir al descubrimiento de nuevos biomarcadores y nuevas estrategias para la mejora de la detección del deterioro cognitivo. La relación de niveles de ácido úrico (AU) y deterioro cognitivo es controversial debido a que algunos autores encontraron que valores altos de AU podrían estar relacionados de manera negativa en el curso de la enfermedad y viceversa. El ácido siálico (AS) mostró un incremento de la concentración en enfermedades malignas y en patologías inflamatorias agudas y esto correlaciona con la mortalidad de los pacientes. Los niveles de AS tienen asociación con FRCV. Sin embargo, no ha sido estudiado en pacientes con FRCV y deterioro cognitivo, por lo que se propone determinar su importancia como marcador temprano del DCL.

OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL PROYECTO

- Evaluar estado cognitivo con estudios que evalúan la memoria, la cognición global y la función ejecutiva en adultos mayores residentes en un área rural de la Provincia de Tucumán.
- Determinar la prevalencia de Deterioro Cognitivo Leve en la población objetivo.
- Establecer factores de riesgo cardiovasculares (FRCV).
- Evaluar si existe asociación entre estado cognitivo y FRCV.
- Estudiar la relación entre niveles séricos de ácido úrico y ácido siálico con el estado cognitivo en la población objetivo.
- Establecer si los biomarcadores séricos propuestos podrían ser marcadores tempranos de la progresión de la enfermedad.

PACIENTES Y METODOLOGÍA

Estudio observacional de corte transversal. Los participantes fueron invitados a partir de grupos poblacionales del Departamento de Leales de la provincia de Tucumán. La UNT posee unidades docente asistenciales permanentes incluida en la Pasantías rurales en esta zona. Previamente firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán y del Centro Científico Tecnológico CONICET-TUCUMAN (CEI UNT-CONICET) en donde se explica en forma clara los objetivos y la metodología que se aplicará. Se procuró tomar todas las medidas y precauciones necesarias para proteger a las personas participantes de este estudio, contra cualquier tipo de daño o molestia mental, física,

de intromisión en su psique o en sus creencias. Se garantizó la confiabilidad de los datos solicitados de las personas participantes y de los resultados analizados. La atención médica y bioquímica fue totalmente gratuita para los participantes. Se trabajó en el Centro de Atención Primaria (CAPS) Viclos pertenece al Área Operativa de Estación Aráoz, que a su vez se encuentra inserta en el Área Programática Este. Viclos se encuentra ubicado en el Departamento de Leales. La distancia que hay hasta la capital de la provincia es de 80 km. La población aproximada es de 1500 a 2000 habitantes. La escala social de la misma está entre media a baja, ya que la mayoría de los pobladores son agricultores de la caña de azúcar, soja y el maíz. Otra fuente laboral que tienen los habitantes de esta población es la comuna rural de la zona. En cuanto al nivel educativo de la zona un 85% de la población aproximadamente es alfabetizada, cuentan con una educación primaria básica y en menor proporción realizaron estudios en el nivel secundario quienes en una gran proporción no lo completaron. La población cuenta con calles de tierra. Las personas se trasladan caminando, en moto o a caballo porque las distancias son más cortas.

Figura 1. Distribución Programática de los Servicios Públicos de Salud de la provincia de Tucumán.



Figura 2. Área Programática Este.



Figura 3. Área Operativa Estación Aráoz.



El área de responsabilidad del CAPS Viclos incluye las siguientes localidades:

- Viclos.
- Cañada de Viclos.
- El Mojón.
- Las Palmitas.
- El Suncho.
- Sol de Mayo.

La población del área de responsabilidad está constituida por 1755 habitantes distribuidos en 481 familias.

Figura 4: Distribución de la población según grupo etario (n=1755)

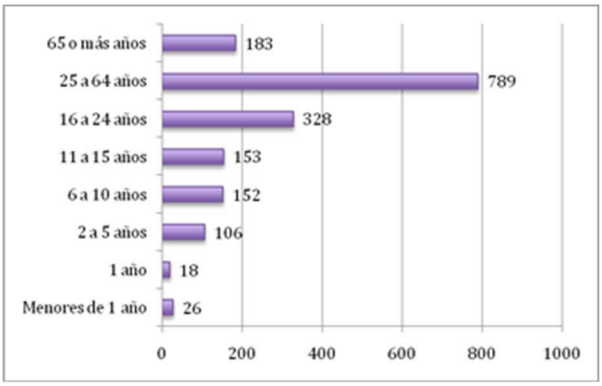
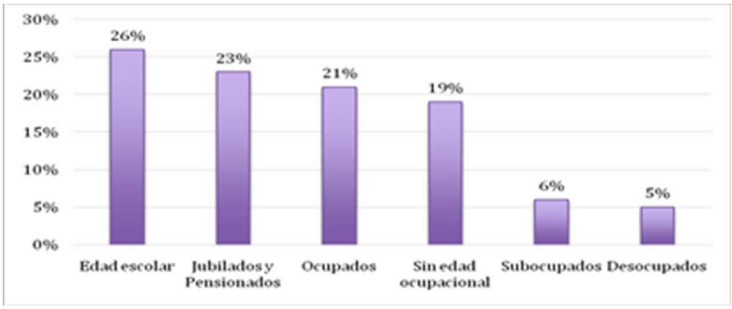


Figura 5: Distribución de población según ocupación (n=1755)



Los Jubilados y pensionados son 405 personas de ambos sexos.

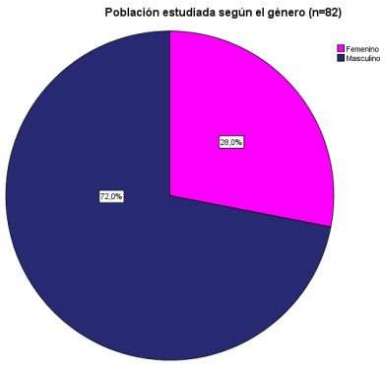
Se realizaron talleres entre los integrantes del proyecto a fin de aunar criterios para la aplicación y puntuación de Mini Mental Test (MMT), complementado para la función ejecutiva por el test del Reloj y Series Alternantes. El MMT evalúa la orientación, fijación, atención recuerdo, lenguaje (se analiza la repetición, comprensión, lectura, escritura, denominación) y función ejecutiva. Debido al nivel de instrucción de la población objetivo se adecuó la atención a restas y sumas hasta el número 10. Se tendrán en cuenta las instrucciones para la administración del Grupo de Trabajo de Neuropsicología Clínica de la Sociedad Neurológica Argentina. Para la evaluación del test del reloj se decidió utilizar la escala de puntuación propuesta por Cacho y col. en donde se asignan 2 puntos a la esfera del reloj, 4 puntos a la presencia y secuencia de los números y 4 puntos a la presencia y localización de las agujas. El test de secuenciación gráfica se le asignan 2 puntos y consiste en la repetición del diseño de una guarda (alternancia entre triángulos y cuadrados) y la copia del bucle (copiar la cantidad idéntica de bucles) detectan los fenómenos de perseveración característicos de la patología cognitiva de origen vascular. Se capacitó a pasantes rurales (alumnos del séptimo año de la Facultad de Medicina), para la recolección de datos y aplicación de los test seleccionados. Se realizaron talleres y se explicó la importancia del proyecto, se determinaron las estrategias que se usarían para su difusión y sensibilización en la población. Se realizaron reuniones de trabajo entre los integrantes del proyecto para diseñar y confeccionar la ficha de recolección de datos para ser aplicada en el trabajo de campo.

El estudio incluyó 82 voluntarios mayores de 60 años, ambos sexos, de un área rural. Criterios de Exclusión: incapacidad física o mental que impide que realicen de manera confiable la entrevista, pacientes con cuadros de ansiedad o depresión y/o patologías sistémicas hepáticas, pancreáticas, renales, estados inflamatorios agudos o crónicos, embarazadas o quienes dan de lactar, que estén recibiendo quimioterapia o radioterapia sistémica. A todos se les realizó el examen físico e historia clínica con datos demográficos, socio económico y personal, consumo de tabaco y alcohol, o de otras drogas, historia familiar de patologías de interés. Se consignó la actividad física y presión arterial. El diagnóstico de HTA se realizó de dos formas: a) autorreporte como antecedente personal; y b) diagnóstico durante la evaluación clínica. Se consideró hipertenso a todos aquellos sujetos con tensión arterial sistólica mayor o igual a 140, tensión arterial diastólica mayor o igual a 90 mm Hg, o con antecedente de diagnóstico

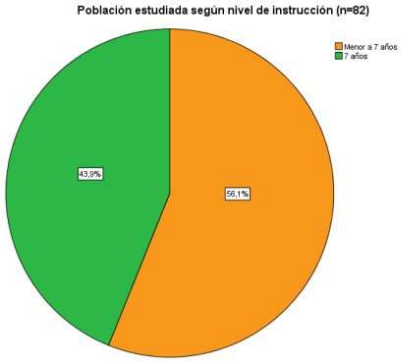
médico para hipertensión arterial. El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso por el cuadrado de su talla (kg/m2). Se define como normal un IMC < a 25, sobrepeso ≥ a 25 y < a 30 y obesidad ≥ 30. Se realizó la evaluación cognitiva con el siguiente algoritmo 1) detección del DC por medio de la entrevista y el examen clínico- neurológico, complementado con un Mini Mental Test (MMT), complementado para la función ejecutiva por el test del Reloj y Series Alternantes, y para la memoria por el Test de Boston. A todas las personas se les tomó una muestra de sangre venosa en las condiciones que corresponda para las determinaciones bioquímicas. Métodos Bioquímicos: El dosaje de glucosa se realizó empleando el método colorimétrico optimizado (Wiener Lab) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Diabetes se consignará por autorreporte o con los criterios diagnósticos de la OMS. Se evaluó el perfil lipídico: determinación de Colesterol total (CT), Triglicéridos (TG), Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y Lipoproteína de baja densidad (LDL) (Wiener Lab). El dosaje de ácido úrico se realizará empleando el método enzimático (Wiener Lab) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La determinación de Ácido Siálico Total se realizó por el método del ácido tiobarbitúrico de Warren en donde se oxidan los ácidos siálicos con periodato de sodio en un medio fuertemente ácido (H3PO4). Los productos de oxidación del periodato son acoplados con ácido tiobarbiturico y el cromóforo resultante (fracción orgánica coloreada) es extraído con Ciclohexanona. La absorbancia del sobrenadante se lee a 549 y 513 nm. Se preparó una curva standard con concentraciones conocidas de N-acetilneuramínico determinada por el mismo método. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 23.0. Los resultados de las variables cualitativas se expresaron en porcentajes y sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Para la comparación de medias entre dos grupos, con variables con distribución normal, se utilizó la prueba de T de Student para datos independientes, mientras que cuando existían más de dos grupos se utilizó ANOVA. La fuerza de asociación de las variables se expresó como OR y sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

RESULTADOS

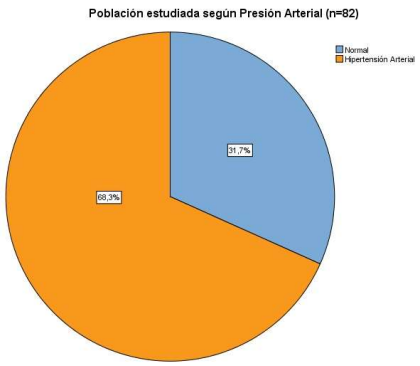
De los 82 individuos entrevistados, 59 fueron hombres y 23 mujeres (Figura 6).



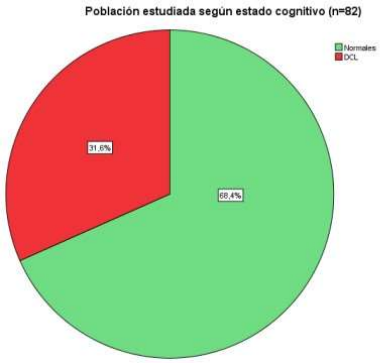
El 56,1% (44,8-67,8) tenían niveles de instrucción menor a 7 años y el 43,9% (32,2-55,2) completaron los 7 años (Figura 7).



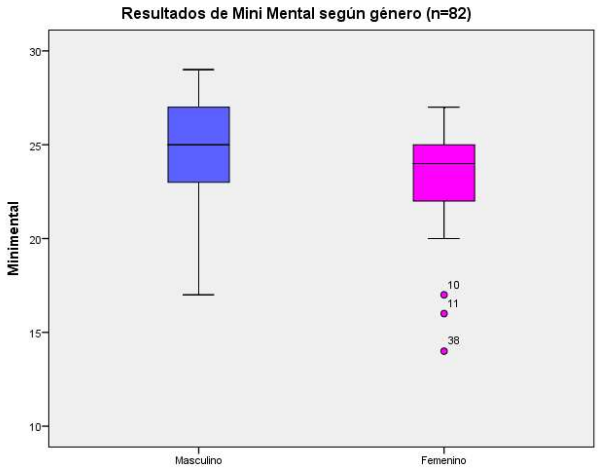
El 47,6% (36,3-59,5) eran menores de 65 años y 52,4% (40,5-63,7) tenían edad mayor o igual a 65 años. El 68,3% (56,7-78,5) eran hipertensos (Figura 8).



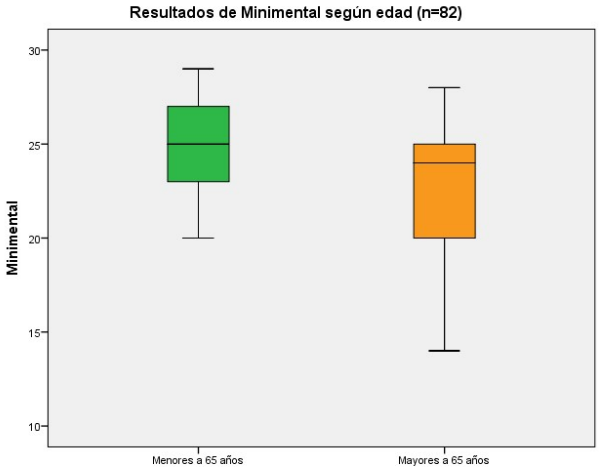
Los participantes se dividieron en dos grupos: GN (n=57) sujetos normales y DCL (n=25) pacientes con deterioro cognitivo leve (Figura 9). La prevalencia de DCL en la población analizada fue de 31,6%. La edad media del GN fue 62,3±10,8 y DCL fue 70,2±7,5 años.



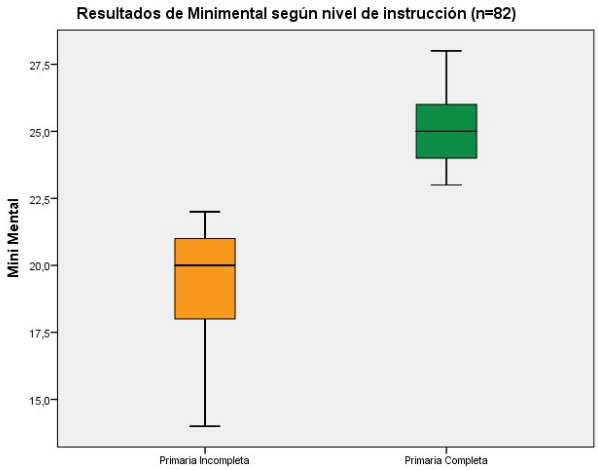
Se encontró diferencias significativas entre pacientes con DCL y el género (varones 24,5±3,0; mujeres 22,9±3,4, p<0,03). (Figura 10).



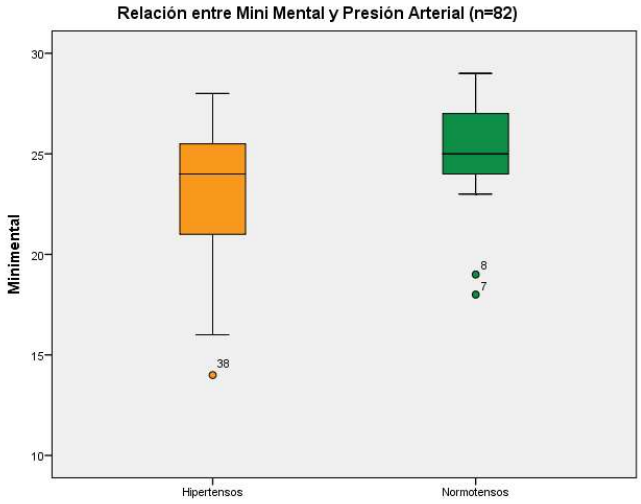
Se encontró diferencias significativas entre pacientes con DCL y la edad (<65 años 25,0±2,3; >65 años 23,0±3,7, p<0,006) (Figura 11).



Se encontró diferencias significativas entre pacientes con DCL y escolaridad (primaria incompleta 22,6±3,4; primaria completa 25,6±1,9, p<0,000). (Figura 12).



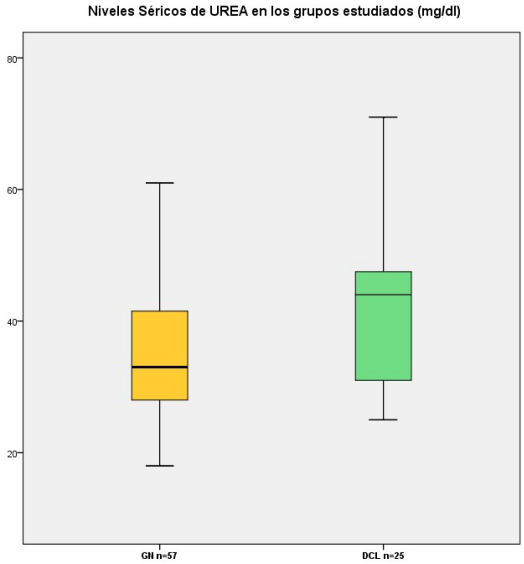
Se encontró diferencias significativas entre pacientes con DCL e HTA (HTA 23,4±3,3; normotensos 25,1±2,5, p<0,02). (Figura 13).



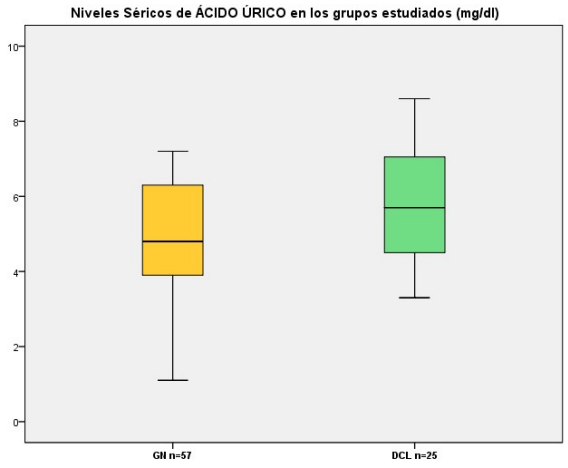
Cuando se realiza el análisis de regresión logística incluyendo las variables edad, sexo, instrucción e HTA el nivel de escolaridad es la única seleccionada con un p<0,003, OR 24,5 (3-198). No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre DCL con el índice de masa corporal y diabetes.

Relación entre DCL con parámetros bioquímicos

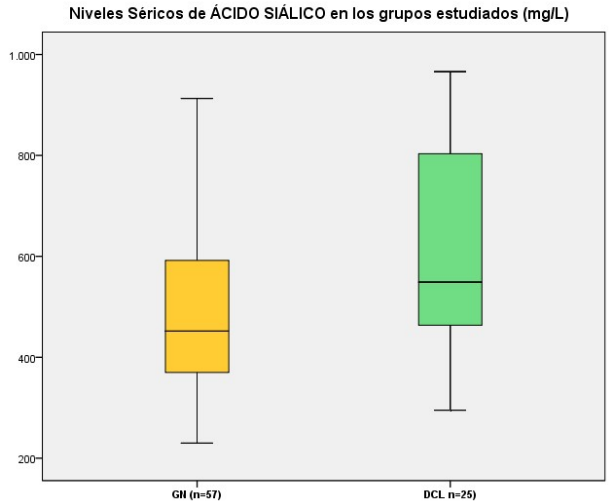
No se encontró relación entre niveles séricos de colesterol, HDL, LDL y triglicéridos de GN y DCL. Los valores media±DE de Urea fueron de 34,8±10,3 y 42,5±12,6 mg/dl ($p<0,007$) para GN y DCL (Figura 14).



Los valores media±DE de Ácido Úrico 4,9±1,6 y 5,8±1,6 mg/dl ($p<0,04$) para GN y DCL (Figura 15).



Los valores media±DE de Ácido Siálico 492,1±157,6 y 600,9±193,9 mg/L (p<0,009) para GN y DCL. (Figura 16).



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La frecuencia encontrada de DCL fue alta (31,6%), con respecto a lo informado por la mayoría de los trabajos (10 % a 22%) lo que podría deberse a las características sociodemográficas descriptas. La aplicación del instrumento fue adaptada en nuestro país en 1999 por el Grupo de Neuropsicología Clínica de la Sociedad Neurológica Argentina referida a la población de Buenos Aires con características socioculturales diferentes al interior del país y más aún a zonas rurales. Es por ello que la frecuencia encontrada genera interrogantes sobre la sensibilidad y especificidad del test para obtener información confiable del estado cognitivo de poblaciones con estas características. La asociación entre DCL y edad, sexo y nivel de educación coinciden con los resultados de otros trabajos, siendo este último un factor que podría ser modificable. La mayoría de ellos una vez concluida su vida escolar practica poco o nada de lectura o escritura. La educación protege contra el deterioro cognitivo, siendo los bajos niveles de instrucción alcanzados un factor de riesgo para desarrollarlo y existe una relación inversa entre el nivel de educación y la frecuencia de enfermedad vascular. Por otra parte, la falta de relación directa entre el daño cerebral y las manifestaciones clínicas de este daño dio como origen el concepto de "reserva cognitiva". Esta se vincula con la capacidad del cerebro para tolerar mejor los efectos de la patología cognitiva y surge como resultado de una habilidad innata o de los efectos, entre otras, de la educación y experiencia. Debido a esto, se trata de un mecanismo activo basado en recursos aprendidos que vincula los niveles educativos bajos con un riesgo mayor de padecer un proceso de deterioro cognitivo. Se encontró asociación entre HTA y DCL. Existen estudios longitudinales que muestran que la presencia de factores de riesgo cardiovascular, especialmente la HTA, favorece la progresión de DCL a demencia. Se ha demostrado que la prevención de factores de riesgo cardiovascular puede suponer una disminución del 50% de la frecuencia de demencia en personas con 65 años o más. La HTA es el factor de riesgo más prevalente y principal causa de mortalidad a nivel mundial.

Publicaciones recientes demuestran que más de la mitad de los pacientes hipertensos con daño renal o cardíaco, presentan en forma silente daño cerebral, consistente en lesiones de la sustancia blanca, infartos lacunares y microhemorragias y un tercio lo presenta sin compromiso de los otros órganos, lesiones que no solo incrementan el riesgo de enfermedad vascular encefálica, sino que podrían ser causa de alteraciones cognitivas y demencia. Más aún y consolidando la idea, en la mayoría de las cohortes que estudiaron longitudinalmente la incidencia de la demencia en relación con la HTA, demostraron que, en enfermos vasculares, era mayor el número de casos de enfermedad de Alzheimer que de demencia vascular. La alta frecuencia de HTA y DCL en los pacientes estudiados, debe conducir a establecer medidas para el control y tratamiento precoz de la HTA ya que, en la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico especifico que haya demostrado disminuir la morbilidad de estas patologías, por el contrario, existen estudios longitudinales que mostraron que actuando efectivamente sobre los factores de riesgo cardiovascular se puede disminuir la progresión a demencia de los pacientes con DCL. Los niveles séricos elevados de urea y ácido úrico pueden deberse al desarrollo de trastornos renales siendo este un factor de riesgo establecido para DCL y demencia. El aumento de ácido siálico sérico estaría relacionado a procesos inflamatorios que ocurren en este síndrome.

Esta investigación es el inicio para realizar estudios longitudinales que puedan establecer la causalidad del deterioro cognitivo e implementar programas de concientización sobre los cuidados que deben implementarse, si se tiene en cuenta el aumento de la expectativa de vida, para retardar la progresión a demencia en esta población. Asimismo, puede dar inicio a futuras investigaciones para promover adaptaciones del MMT según las características sociodemográficas de las poblaciones estudiadas que hagan más confiable el uso de este instrumento, sobre todo teniendo en cuenta el nivel de instrucción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO. Study on Global Ageing and Adult Health. Disponible en http://www.who.int/topics/ageing/es.
2. Li D, Jia Y, Yu J, Liu Y, Li F, Zhang W, Gao Y, Liao X, Wan Z, Zeng Z, Zeng R. Cognition impairment and risk of subclinical cardiovascular disease in older adults: The atherosclerosis risk in communities study. Front Aging Neurosci. 2022 Jul 27; 14:889543. doi: 10.3389/fnagi.2022.889543.
3. Boytsov SA, Samorodskaya IV. Serdechno-sosudistye zabolevaniya i kognitivnye narusheniya [Cardiovascular disease and cognitive impairment]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. 2022;122(7):7-13. Russian. doi: 10.17116/jnevro20221220717.
4. Tang X, Zhao W, Lu M, Zhang X, Zhang P, Xin Z, Sun R, Tian W, Cardoso MA, Yang J, Simó R, Zhou JB, Stehouwer CDA. Relationship between Central Obesity and the incidence of Cognitive Impairment and Dementia from Cohort Studies Involving 5,060,687 Participants. Neurosci Biobehav Rev. 2021 Nov; 130:301-313. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.08.028.
5. Vorobyeva OV, Pilipovich AA, Nikulina KV. Vliyanie vozrasta i gendera na kharakteristiki narusheniya kognitivnykh funktsii u patsientov s faktorami serdechno-sosudistogo riska [The influence of age and gender on the characteristics of cognitive impairment in patients with cardiovascular risks]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S

Korsakova. 2022;122(6):85-92. Russian. doi: 10.17116/jnevro202212206185.

6. Sikaroodi H, Yadegari S, Miri SR. Cognitive impairments in patients with cerebrovascular risk factors: a comparison of Mini Mental Status Exam and Montreal Cognitive Assessment. Clin Neurol Neurosurg. 2013 Aug;115(8):1276-80. doi: 10.1016/j.clineuro.2012.11.026.
7. Borrás Blasco C, Viña Ribes J. Neurofisiología y envejecimiento. Concepto y bases fisiopatológicas del deterioro cognitivo [Neurophysiology and ageing. Definition and pathophysiological foundations of cognitive impairment]. Rev Esp Geriatr Gerontol. 2016 Jun;51 Suppl 1:3-6. Spanish. doi: 10.1016/S0211-139X(16)30136-6
8. Tsoi KK, Chan JY, Hirai HW, Wong SY, Kwok TC. Cognitive Tests to Detect Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Intern Med. 2015 Sep;175(9):1450-8. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.2152.
9. Jia X, Wang Z, Huang F, Su C, Du W, Jiang H, Wang H, Wang J, Wang F, Su W, Xiao H, Wang Y, Zhang B. A comparison of the Mini-Mental State Examination (MMSE) with the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) for mild cognitive impairment screening in Chinese middle-aged and older population: a cross-sectional study. BMC Psychiatry. 2021 Oct 4;21(1):485. doi: 10.1186/s12888-021-03495-6.
10. Allegri, R. F., Ollari, J. A., Mangone, C. A., Arizaga, R. L., De Pascale, A., Pellegrini, M., ... & Taragano, F. E. (1999). El "Mini Mental State Examination" en la Argentina: instrucciones para su administración. Revista Neurológica Argentina, 24(1), 31-35.
11. Qin J, He Z, Wu L, Wang W, Lin Q, Lin Y, Zheng L. Prevalence of mild cognitive impairment in patients with hypertension: a systematic review and meta-analysis. Hypertens Res. 2021 Oct;44(10):1251-1260. doi: 10.1038/s41440-021-00704-3.
12. Lorenzo-López L, Millán-Calenti JC, López-López R, Diego-Diez C, Laffon B, Pásaro E, Valdiglesias V, Maseda A. Effects of Degree of Urbanization and Lifetime Longest-Held Occupation on Cognitive Impairment Prevalence in an Older Spanish Population. Front Psychol. 2017 Feb 13; 8:162. doi: 10.3389/fpsyg.2017.00162.
13. Lu S, Shao L, Zhang Y, Yang Y, Wang Z, Zhang B, Yu J, Xu Q, Wang S, Chen X, Yu Z, Ren Y, Hong K. Predictive Value of Gut Microbiome for Cognitive Impairment in Patients with Hypertension. Dis Markers. 2021 Oct 6; 2021:1683981. doi: 10.1155/2021/1683981.
14. Gómez-Martínez C, Babio N, Júlvez J, Becerra-Tomás N, Martínez-González MÁ, Corella D, Castañer O, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, López-Miranda J, Bueno-Cavanillas A, Gaforio JJ, Matía-Martín P, Daimiel L, Martín-Sánchez V, Vidal J, Vázquez C, Ros E, Dalsgaard S, Sayón-Orea C, Sorlí JV, de la Torre R, Abete I, Tojal-Sierra L, Barón-López FJ, Fernández-Brufal N, Konieczna J, García-Ríos A, Sacanella E, Bernal-López MR, Santos-Lozano JM, Razquin C, Alvarez-Sala A, Goday A, Zulet MA, Vaquero-Luna J, Diez-Espino J, Cuenca-Royo A, Fernández-Aranda F, Bulló M, Salas-Salvadó J. Glycemic Dysregulations Are Associated With Worsening Cognitive Function in Older Participants at High Risk of Cardiovascular Disease: Two-Year Follow-up in the PREDIMED-Plus Study. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Oct 29; 12:754347. doi: 10.3389/fendo.2021.754347.

15. Pettigrew C, Soldan A. Defining Cognitive Reserve and Implications for Cognitive Aging. Curr Neurol Neurosci Rep. 2019 Jan 9;19(1):1. doi: 10.1007/s11910-019-0917-z.

16. Evans IEM, Llewellyn DJ, Matthews FE, Woods RT, Brayne C, Clare L; CFAS-Wales research team. Social isolation, cognitive reserve, and cognition in healthy older people. PLoS One. 2018 Aug 17;13(8): e0201008. doi: 10.1371/journal.pone.0201008.

17. Poh L, Sim WL, Jo DG, Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chen CL, Lai MKP, Fann DY, Arumugam TV. The role of inflammasomes in vascular cognitive impairment. Mol Neurodegener. 2022 Jan 9;17(1):4. doi: 10.1186/s13024-021-00506-8.

18. Zuo W, Wu J. The interaction and pathogenesis between cognitive impairment and common cardiovascular diseases in the elderly. Ther Adv Chronic Dis. 2022 Feb 2;13: 20406223211063020. doi: 10.1177/20406223211063020.

19. Vicario A. Guía para la Evaluación de Trastornos Cognitivos en pacientes con enfermedad vascular. Rev Arg Fed Cardiol. 1-96; 2013.

20. Wade AT, Davis CR, Dyer KA, Hodgson JM, Woodman RJ, Keage HA, Murphy KJ. A Mediterranean Diet to Improve Cardiovascular and Cognitive Health: Protocol for a Randomised Controlled Intervention Study. Nutrients. 2017 Feb 16;9(2):145. doi: 10.3390/nu9020145.

21. Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, de la Torre R, Martínez-González MÁ, Martínez-Lapiscina EH, Fitó M, Pérez-Heras A, Salas-Salvadó J, Estruch R, Ros E. Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. JAMA Intern Med. 2015 Jul;175(7):1094-1103. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.1668. Erratum in: JAMA Intern Med. 2018 Dec 1;178(12):1731-1732.

22. Abi Saleh R, Lirette ST, Benjamin EJ, Fornage M, Turner ST, Hammond PI, Mosley TH, Griswold ME, Windham BG. Mediation effects of diabetes and inflammation on the relationship of obesity to cognitive impairment in African Americans. J Am Geriatr Soc. 2022 Aug 8. doi: 10.1111/jgs.17985.

23. Dove A, Shang Y, Xu W, Grande G, Laukka EJ, Fratiglioni L, Marseglia A. The impact of diabetes on cognitive impairment and its progression to dementia. Alzheimers Dement. 2021 Nov;17(11):1769-1778. doi: 10.1002/alz.12482.

24. Hamed SA. Neurologic conditions and disorders of uremic syndrome of chronic kidney disease: presentations, causes, and treatment strategies. Expert Rev Clin Pharmacol. 2019 Jan;12(1):61-90. doi: 10.1080/17512433.2019.1555468.

25. Viggiano D, Wagner CA, Martino G, Nedergaard M, Zoccali C, Unwin R, Capasso

G. Mechanisms of cognitive dysfunction in CKD. Nat Rev Nephrol. 2020 Aug;16(8):452-469. doi: 10.1038/s41581-020-0266-9.

26. Assem M, Lando M, Grissi M, Kamel S, Massy ZA, Chillon JM, Hénaut L. The Impact of Uremic Toxins on Cerebrovascular and Cognitive Disorders. Toxins (Basel). 2018 Jul 22;10(7):303. doi: 10.3390/toxins10070303.

27. Franco ÁO, Starosta RT, Roriz-Cruz M. The specific impact of uremic toxins upon cognitive domains: a review. J Bras Nefrol. 2019 Jan-Mar;41(1):103-111. doi: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0033.

28. Angermann S, Günthner R, Hanssen H, Lorenz G, Braunisch MC, Steubl D, Matschkal J, Kemmner S, Hausinger R, Block Z, Haller B, Heemann U, Kotliar K, Grimmer T, Schmaderer C. Cognitive impairment and microvascular function in end-stage renal disease. Int J Methods Psychiatr Res. 2022 Jun;31(2): e1909. doi: 10.1002/mpr.1909.

29. Sun J, Lv X, Gao X, Chen Z, Wei D, Ling Y, Zhang J, Gu Q, Liu J, Chen W, Liu S. The association between serum uric acid level and the risk of cognitive impairment after ischemic stroke. Neurosci Lett. 2020 Aug 24; 734:135098. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135098.

30. Su C, Hu D, Wang X, Chen P, Fu Z, Zhang Z, Wang Z, Wang H, Zhang B. Association between mild cognitive impairment and serum uric acid levels among people aged 55 and above in 4 provinces of China. Wei Sheng Yan Jiu. 2021 Jan;50(1):8-14. Chinese. doi: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2021.01.003.

31. Tana C, Ticinesi A, Prati B, Nouvenne A, Meschi T. Uric Acid and Cognitive Function in Older Individuals. Nutrients. 2018 Jul 27;10(8):975. doi: 10.3390/nu10080975.

32. Cheeseman J, Kuhnle G, Stafford G, Gardner RA, Spencer DI, Osborn HM. Sialic acid as a potential biomarker for cardiovascular disease, diabetes and cancer. Biomark Med. 2021 Aug;15(11):911-928. doi: 10.2217/bmm-2020-0776.

33. Bansal P, Bansal P, Verma R. Association of serum sialic acid concentration with diabetic complications and cardiovascular risk factors in an Indian population. Arch Med Sci Atheroscler Dis. 2021 Apr 9;6: e14-e17. doi: 10.5114/amsad.2021.105142.

34. Davis G, Baboolal N, Nayak S, McRae A. Sialic acid, homocysteine and CRP: potential markers for dementia. Neurosci Lett. 2009 Nov 20;465(3):282-4. doi: 10.1016/j.neulet.2009.09.035.

35. Yadav J, Verma AK, Garg RK, Ahmad K, Shiuli, Mahdi AA, Srivastava S. Sialic acid associated with oxidative stress and total antioxidant capacity (TAC) expression level as a predictive indicator in moderate to severe Alzheimer's disease. Exp Gerontol. 2020 Nov; 141:111092. doi: 10.1016/j.exger.2020.111092.

ABSTRACT

Objective: To determine the association of sociodemographic variables, arterial hypertension (AH), diabetes and body mass index (BMI) and biochemical parameters with Mild Cognitive Impairment (MCI) in older adults in a rural area of Tucumán. Methodology: Observational, analytical, cross-sectional study. 82 volunteers over 60 years of age, of both sexes, with informed consent, participated. A clinical history was made with sociodemographic data, and blood pressure, diabetes, and BMI were recorded. The cognitive evaluation consisted of a mini-mental Test, a clock test, and graphic sequencing. Biochemical Methods: lipid profile, urea, uric acid (UA) and sialic acid (SA). Statistical analysis was performed with SPSS version 23.0. Results: The participants were divided into NG (n=57) normal subjects and MCI (n=25). Significant differences were found between patients with MCI and gender (men 24.5$\pm$3.0; women 22.9$\pm$3.4, $p<0.03$), age (<65 years 25.0+2.3; >65 years old 23.0$\pm$3.7, $p<0.006$), schooling (incomplete primary school 22.6$\pm$3.4; complete primary school 25.6$\pm$1.9, $p<0.000$), AH (AH 23.4$\pm$3.3, normotensive 25.1$\pm$2.5, $p<0.02$). When the logistic

regression analysis is performed, schooling is the only one selected ($p<0.003$). No association was found between MCI with BMI, diabetes, cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides. The mean+SD values of Urea were 34.8 ± 10.3 and 42.5 ± 12.6 mg/dl ($p<0.007$); UA 4.9 ± 1.6 and 5.8 ± 1.6 mg/dl ($p<0.04$); SA 492.1 ± 157.6 and 600.9 ± 193.9 mg/L ($p<0.009$) for NG and MCI, respectively. Conclusion: the association of age, sex, and educational levels with MCI coincide with other works, being low educational level is a modifiable risk factor. The association of AH and MCI should lead to the establishment of measures to control hypertension since its association with cognitive alterations and dementia has been demonstrated. Urea and UA levels could be related to kidney disorders, a risk factor for MCI and dementia, and SA would be related to inflammatory processes that occur in this syndrome.

IMPLICANCIAS CLÍNICAS DE LAS ESPECIES CRIPTICAS DE PARACOCCIDIOIDES

María de los Ángeles Sosa

Instituto de Medicina Regional - Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

La paracoccidioidomicosis (PCM) es la más frecuente de las micosis sistémicas endémicas de América Latina. En Brasil actualmente ha sido considerada entre las enfermedades olvidadas. Su agente etiológico es el hongo dimórfico del género Paracoccidioides y, en Argentina, el área endémica más extensa se ubica en el nordeste (NEA) incluyendo las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes, Misiones, norte de Entre Ríos y de Santa Fe y parte de Santiago del Estero. En el noroeste se presenta sólo en el norte de Salta y este de Jujuy.

La fuente de infección está en la naturaleza y la puerta de entrada es la vía inhalatoria. Los propágulos aéreos del hongo son los elementos infectantes. Las formas clínicas van desde la infección asintomática hasta procesos diseminados graves y fatales con el compromiso de varios órganos. En la mayoría de los casos, luego de la inhalación del hongo se presenta una infección asintomática que suele entrar en latencia. La PCM se inicia entonces como una infección pulmonar primaria que, generalmente, pasa inadvertida, pero puede diseminarse por vía linfática o sanguínea. Las formas clínicas se clasifican en: Infección (subclínica) y PCM enfermedad donde se discriminan la forma aguda o subaguda (Tipo juvenil), la forma crónica (Tipo adulto) y la forma residual. La forma crónica representa aproximadamente el 90% de los casos informados y se presenta con compromiso pulmonar primario y manifestaciones extra-pulmonares secundarias. El pronóstico de la enfermedad depende de la gravedad, así como de las enfermedades concomitantes existentes. La presentación aguda infanto-juvenil tiene mayores tasas de mortalidad y la crónica mayores secuelas a largo plazo e incluso invalidante.

En el NEA, la PCM históricamente se presentó con la forma crónica del adulto, pero en los últimos años se ha observado la reemergencia de esta enfermedad con un aumento de la incidencia y un amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo manifestaciones muy poco frecuentes. Junto a esto, se detectaron casos de formas subagudas infanto-juveniles, algunas progresivas y muy severas. Un importante porcentaje de casos de ambas formas clínicas tuvieron serología negativa y, por otro lado, si bien la PCM tradicionalmente afecta a la población de áreas rurales, muchos de ellos fueron casos totalmente urbanos donde el paciente no refiere contacto con el ámbito rural. Hasta el año 2006 *Paracoccidioides brasiliensis* era considerado el único agente etiológico. Actualmente por métodos moleculares se determinaron distintos genotipos (S1, PS2, PS3, PS4) que guardan cierta relación con su distribución geográfica (**1**) También se propuso una nueva especie, *P. lutzii*, morfológicamente indistinguible de *P. brasiliensis*. El descubrimiento de que *Paracoccidioides* incluye varios genotipos y especies, podría ser una de las explicaciones para las variantes observadas. Poco se sabe

sobre la distribución geográfica de los genotipos y especies de *Paracoccidioides*, menos aún en Argentina. Este desconocimiento, tal vez, sea el responsable de lo problemático que ha sido y sigue siendo el diagnóstico. La baja sensibilidad de los métodos convencionales en determinados casos y la falta de reacción antígeno-anticuerpo de otros pueden generar subdiagnóstico de la PCM y, en el caso de las formas infanto-juveniles, una mortalidad mayor a la esperada.

En el año 2015 el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (ANLIS- Malbrán) envío a toda la Red de Laboratorios del país una alerta acerca de la aparición de una reemergencia de la PCM en el NEA, un aumento de la incidencia, manifestaciones clínicas poco frecuentes, casos subagudos infanto-juveniles progresivos y severos y casos de localización urbana siendo la PCM tradicionalmente relacionada a población rural.

El objeto principal de este trabajo es estudiar los casos de PCM del NEA, describir los aspectos clínicos y epidemiológicos y estudiar la relación con él o los genotipos circulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes.

Ubicación, época y diseño.

Se realizo un estudio ambispectivo. Retrospectivo de todos los casos de PCM registrados en el Estudio Multicéntrico Argentino que fueron derivados al Área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste entre los años 2013 y 2018. Se continuo un estudio prospectivo hasta el año 2020 de todos los casos nuevos de pacientes con diagnóstico de PCM con aislamiento del agente en cultivo susceptible de identificación molecular por secuenciación.

Análisis clínico y sociodemográfico.

22 pacientes de los cuales se aisló *Paracoccidioides* participaron en el estudio. Los datos recopilados de la base de datos de historias clínicas de pacientes con PCM comprenden: edad, género, ciudad donde viven, ocupación, actividad agrícola, infección por VIH, síntomas, forma clínica de PCM, gravedad, órganos afectados y evolución.

La forma clínica de PCM se clasificó en aguda/subaguda o crónica, según Shikanai Yasuda y col, 2017**(2)**.

En todos los casos se aseguró la total disociación de los datos de identidad para preservar la confidencialidad de los pacientes, según consta en la Ley Nacional de 26529 y su modificatoria 26742 sobre los derechos del paciente en su relación con los profesionales e instituciones de salud.

Métodos.

Cepas fúngicas.

22 cepas fúngicas fueron recolectadas de diferentes fuentes, incluidas 3 lesiones de piel, 4 aspirados de ganglios linfáticos, 7 biopsias de lesiones orales, 1 muestra de BAL, 1 biopsia de hueso, 1 biopsia pulmonar, 3 esputos y 2 aspirados de lesion cerebral. Fueron identificados como pertenecientes al género *Paracoccidioides spp*. por métodos clásicos

de identificación de hongos. Estos aislados clínicos se mantuvieron a 35 C, en forma levaduriforme, en medio Fava-Netto para su posterior genotipado.

Las cepas de referencia utilizadas en este estudio son Pb18, representativas de *P. brasiliensis sensu stricto* (S1); PbO3, considerada especie de *P. americana* (P S2), PB339 representante de *P. restrepiensis* (PS3) y Pb01, que representa a *P. lutzii.*

Mantenimiento de las cepas.

Debido a que Paracoccidioides es un hongo dimórfico de difícil desarrollo in vitro se realizaron subcultivos de los aislamientos en distintos medios y a diferentes temperaturas. Para la preservación de las cepas en su fase filamentosa se realizaron subcultivos cada 45 días en agar papa dextrosa con cicloheximida y agar Sabouraud dextrosa, a 28ºC.

Para el desarrollo de la fase levaduriforme las cepas fueron subcultivadas en agar FavaNetto (proteosa peptona 0.3%, peptona 1%, extracto de carne 0.5%, NaCl 0.5%, dextrosa 4%, extracto de levadura 0.5% agar 1.5%. pH7.2-7.4), agar Sabouraud y en medio líquido de YPG (glucosa 2 %, peptona 0.5 %, extracto de levadura 1%) a 35°C cada 10 días. Para enriquecer los medios periodicamente fue agregado suero fetal bovino.

Extracción de ADN genómico de cepas de Paracoccidioides.

Los ADN genómicos aislados de células de levadura Paracoccidioides (cepas clínicas y de referencia) se obtuvieron usando un metodo manual de CTAB según Chen y col **(3)** y cuantificado mediante el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, Estados Unidos).

Identificación de especies de Paracoccidioides por métodos moleculares.

Los aislamientos clínicos de pacientes con PCM se genotipificaron (tub1-PCR-RFLP) para determinar su especie filogenética, siguiendo la metodología descrita previamente por Roberto y col. **(4)**.

Análisis Multilocus de Secuencias (MLSA).

Para estudiar la sub especiacion de los aislamientos se realizó el análisis multilocus de las secuencias genómicas según lo propuesto por Texeira y col. **(13)** utilizando 3 regiones del genoma de Paracoccidiodes (Tabla 1).

Tabla 1: Regiones del genoma de *Paracoccidiodes* estudiadas y cebadores utilizados.

Region del DNA estudiada	Nombre de Cebadores	Secuencia	Referencia
Glicoproteina 43 Exon 2	Gp43-E2	5-CCAGGAGGCGTGCAGGTGTCCC-3 5-GCCCCCTCCGTCTTCCATGTCC-3	Cisalpino y col, 1996 (4)
Factor de adenilribosilación	ARF	5-TCTCATGGTTGG CCTCGATGC-3 5-GACCCTCGACGACACGGTCACGATC-3	Kasuga y col, 2002 (5)
α Tubulina 1	αTub 1	5-CTGGGAGGTATGATAACACTGC-3 5-CGTCGGGCTATTCAGATTTAAG-3	Roberto et al, 2016 (6)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a un volumen final de 50 uL, consistiendo en 1X de Buffer de reaccion, 1.5 mM de Cl2Mg, 0.5 uM de cada oligonucleotido, 0.20 mM of dNTPs, 1.25 U of Taq polimerasa y 80 ng de DNA genomico. El protocolo de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalizacion de 2 minutos a 94ºC, amplificación de 35 ciclos de desnaturalización a 94ºC por 30 segundos, *anneling* (64ºC para gp43, 58ºC para ARF y 48ºC para α-Tub) por 30 segundos y una extension final de 72 ºC por un minuto. Una etapa final de 5 minutos de extensión final a 72 ºC.

La visualización de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa (Biodinamycs) al 2,5 % en bufferTAE 1X adicionado con 0,5 µg de gel Red/ml (Biotium). La corrida electroforética se realizó a 90 voltios durante 30 min. Se utilizó buffer de siembra 6X (azul de bromofenol, Biodinamycs) y marcador de peso molecular (Cienmarker, Biodnamycs S.R.L).

Para documentar los geles se utilizó un transiluminador Modelo M-26 UVP (UVP, Upland, Canadá). Sistema para documentación de geles UVP programa Visión Works 3.1 (UVP, Cambridge, UK). El análisis de los geles se realizó con el programa UViTec Pro. Los productos analizados fueron purificados utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche) y cuantificados por espectofotometria usando NANODROP 2000c (Thermo Scientific).

Los fragmentos amplificados fueron enviados a *Macrogen Latin America SRL* para su secuenciacion. Las secuencias recibidas con una alta calidad de electroferograma fueron utilizadas para el análisis genómico. Fueron alineadas utilizando el software BioEdit mediante el algoritmo de Clustal y editadas manualmente para corregir cualquier base mal alineada. Las secuencias de las regiones amplificadas de *Paracoccidioides* spp. depositadas previamente en GenBank serán utilizadas como guía taxonómica para identificar los aislamientos de Paracoccidioides y la descripción a nivel de especie de cada uno de ellos.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba exacta de Fisher para la comparación de dos frecuencias de muestras independientes La significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El software estadístico utilizado fue SPSS IBM, versión 28.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aspectos sociodemográficos y clínicos de esta serie de casos de PCM.

Las características sociodemográficas de los pacientes con PCM incluidos en el estudio se presentan en la **Tabla 2**. Del total de casos estudiados el 81.8% fueron hombres (18/22) con una relación hombre:mujer de 4,5 a 1. Con una edad media de 46 años (Rango: 8-75 años), siendo 72.7 % (16/22) mayores de 40 años. En cuanto a la ocupación, el 41% (9/22) presenta antecedentes de haber realizado actividades agrícolas con riesgo de infección por *Paracoccidioides* spp.

Tabla 2: Caracteristicas sociodemograficas de los casos de PCM estudiados, 2013-2020.

Caso de PCM	Sexo	Edad	Lugar de Nacimiento	Lugar de Diagnostico	Actividad Agrícola
1	M	71	Villa Rica, Py	Buenos Aires, Argentina	SI
2	F	58	Corrientes, Arg.	Corrientes, Arg.	NO
3	M	40	Chaco, Arg.	Chaco, Arg.	SI
4	F	22	Jujuy, Arg.	Jujuy, Arg.	NO
5	M	66	Chaco, Arg.	Chaco, Argentina	NO
6	M	39	Chaco, Arg.	Chaco, Argentina	SI
7	M	57	Santa Fe, Arg.	Santa Fe, Argentina	SI
8	M	55	Paraguay	Buenos Aires, Argentina	SI
9	M	64	Corrientes, Arg.	Corrientes, Arg.	NO
10	M	55	Pocitos, Bolivia	Salta, Arg.	SI
11	M	69	Corrientes, Arg.	Corrientes, Arg.	NO
12	M	50	Chaco, Arg.	Chaco, Arg.	SI
13	F	75	Salta, Arg.	Salta, Arg.	NO
14	M	33	Chaco, Arg.	Chaco, Arg.	SI
15	M	36	Ciudad del Este, Py	Buenos Aires, Arg.	NO
16	M	48	Paraguay	Buenos Aires, Arg.	NO
17	M	71	Paraguay	Buenos Aires, Arg.	NO
18	M	47	Corrientes, Arg.	Corrientes, Arg.	SI
19	M	21	Formosa, Arg.	Formosa, Arg.	NO
20	F	64	Salta, Arg.	Salta, Arg.	NO
21	M	8	Chaco, Arg.	Chaco, Arg.	NO
22	M	66	Misiones, Arg.	Misiones, Arg.	NO

El hábitat natural del hongo *Paracoccidioides* es el suelo o los vegetales de áreas endémicas, por lo que los pacientes afectados con mayor frecuencia son los adultos dedicados a labores rurales, principalmente entre los 30 y los 50 años. Existe un predominio del sexo masculino, que varía de acuerdo con la zona endémica entre 14:1 y 70:11**(1)**.

La alta prevalencia en el sexo masculino se debe no solo a la relación que existe entre la actividad laboral y la enfermedad, sino también al efecto protector de los estrógenos en el sexo femenino. Los receptores 17-β-estradiol en el citoplasma de Paracoccidioides interactúan con la hormona femenina e inhiben la transformación de la forma micelial a levadura del hongo, lo que impide este paso indispensable para que se establezca la infección **(7)** De las 4 mujeres estudiadas en esta serie de casos 3 mujeres se encontraban en etapa menopáusica, mientras que la restante se encontraba embarazada.

El 86.3 % de los casos de PCM se clasificaron como forma crónica (19/22). El promedio de edad y el predominio de la forma clínica del adulto de los pacientes de este estudio coinciden con lo informado por otros autores **(8,9)**, sin embargo la relación hombre: mujer es menor a lo encontrado por los mismos autores.

Dieciséis pacientes (72,7%) tenían al menos un órgano extrapulmonar afectado (**Tabla 3**) y dos pacientes fallecieron durante el estudio. El 86.3% correspondieron a formas crónicas del adulto. En coincidencia con otros autores se observa una alta tasa de afectación mucocutánea **(8-10)**, en especial la zona de la mucosa yugal. También se observaron formas unifocales como las de hueso y en SNC.

En la tabla 3 se puede observar que la observación de linfoadenomegalia superficial es más frecuente en el subtipo S1b. Si bien la mayoría de los casos correspondieron a formas crónicas del adulto, se observó inflamación de ganglios superficiales como un rasgo distintivo en muchos casos.

Tabla 3: Órganos afectados en los 22 casos de PCM estudiados estratificado por subtipo.

Órganos afectados	*P. brasiliensis sensu stricto S1a* (n =11)	P.brasiliensis sensu stricto S1b (n =11)	P valor
Piel	0	2	0.52
Ganglios linfáticos	0	6	**0.004**
Mucosa	6	5	0.13
Pulmones	4	3	0.647
Sistema nervioso	2	0	0.52
Tejido óseo	1	0	0.316

Identificación de especies de Paracoccidioides y localización geográfica de los casos de PCM.

Todos los aislamientos que fueron genotipificados por tub1-PCR-RFLP revelaron la circulación de una única especie de *Paracoccidiodies brasiliensis sensu stricto* S1. Esto concuerda con lo observado en otros trabajos **(11-14)**. De la secuenciación de los aislados se hallaron 11 cepas de S1a y 11 cepas de S1b. El 72.7 % de los pacientes son de Argentina (16/22), de los cuales 13 pertenecen a la región del NEA y 3 son de la región NOA. 1 paciente de Bolivia y 5 de Paraguay. En la **Tabla 4** se puede observar que la subespecie S1a es mas frecuente en la región del NEA en Argentina (p= 0.002).

Tabla 4: Distribución geográfica de las cepas de *Paracoccidioides* Identificados por biología molecular.

Caso de PCM	Otra identificación	Localización Geográfica	Tub 1-PCR RFLP	Secuenciación MSLT
1	M	PARAGUAY	S1	S1b
2	F	NEA	S1	S1a
3	M	NEA	S1	S1a
4	F	NOA	S1	S1b
5	M	NEA	S1	S1a
6	M	NEA	S1	S1a
7	M	NEA	S1	S1a
8	M	PARAGUAY	S1	S1b
9	M	NEA	S1	S1a
10	M	BOLIVIA	S1	S1b
11	M	NEA	S1	S1a
12	M	NEA	S1	S1a
13	F	NOA	S1	S1b
14	M	NEA	S1	S1a
15	M	PARAGUAY	S1	S1b
16	M	PARAGUAY	S1	S1b
17	M	PARAGUAY	S1	S1b
18	M	NEA	S1	S1b

19	M	NEA	S1	S1b
20	F	NOA	S1	S1a
21	M	NEA	S1	S1b
22	M	NEA	S1	S1a

CONCLUSIONES

Este estudio descriptivo nos permitió conocer la epidemiologia molecular de las especies de Paracoccidioides en la región, así como la caracterización de los aspectos sociodemográficos de los pacientes estudiados.

Se presentó una serie de veintidós casos de PCM que fueron diagnosticados en Argentina, a partir de los cuales se aislaron y genotipificaron cepas clínicas de Paracoccidioides. Los pacientes provenientes de Bolivia y Paraguay fueron estudiados en un nosocomio de Buenos Aires. Los resultados mostraron que el 100% de los aislados son *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto* (S1) y que está constituido por 2 poblaciones S1a y S1b. Con respecto a las características clínicas y epidemiológica de estos pacientes con PCM, se halló una relación estadísticamente significativa entre el subgenotipo S1b y la presentación de linfoadenomegalia superficial.

Este estudio sugiere que *P. brasiliensis sensu stricto* S1a es la especie predominante en la región del nordeste argentino, sin embargo, es necesario ampliar el número de cepas estudiadas para generalizar los resultados obtenidos en este trabajo.

La mejor opción para identificar las especies de *Paracoccidioides* es el enfoque molecular utilizando aislamientos clínicos; sin embargo, el aislamiento en cultivo presenta una alta tasa de falla. De esta manera el diagnostico convencional se realiza por la observación del hongo en los exámenes directos o la serología positiva. Por ejemplo, a pesar de que este estudio ha incluido solo 22 casos de PCM, esta serie proviene de más de 200 casos estudiados y diagnosticados entre 2013 y 2020, por lo que en la mayoría de los casos fue difícil aislar el hongo o en algunos casos no se realizó el cultivo en origen.

Ocuparse de su problemática, con un conocimiento real de su epidemiología, permite instaurar programas educativos para la comunidad, pero también, información para un mejor manejo por parte de la comunidad de salud. Los resultados obtenidos representan un importante aporte en nuestra región para la micología médica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Teixeira MM, Theodoro RC, Freire F, Oliveira M, Machado GC, Hahn RC, et al. Paracoccidioides lutzii sp. nov.: biological and clinical implications. Medical Mycology. 2014(52):19–28. https://doi.org/10.3109/13693786.2013.794311 PMID: 23768243
2. M.A. Shikanai-Yasuda, R.P. Mendes, A.L. Colombo, F. Queiroz-Telles, A.S.G. Kono, A.M.M. Paniago, A. Nathan, A.C.F.D. Valle, E. Bagagli, G. Benard, M.S. Ferreira, M.M. Teixeira, M.L. Silva-Vergara, R.M. Pereira, R.S. Cavalcante, R. Hahn,

R.R. Durlacher, Z. Khoury, Z.P. Camargo, M.L. Moretti, R. Martinez. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop., 50 (2017), pp. 715-740

3. Chen H., Rangasamy M., Tan S. Y., Wang H., Siegfried B. D. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. 2010. PLoS ONE 5: e11963. (doi:10.1371/journal. pone.0011963).
4. Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MIN, Silveira JF, Travassos LR, 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis. J Biol Chem 271:* 4553–4560
5. Kasuga T, White TJ, Taylor JW. Estimation of nucleotide substitution rates in Eurotiomycete fungi. Mol Biol Evol 2002; 19:2318–2324
6. Roberto, Thiago N; Rodrigues, Anderson M, Hahn, Rosane C; Pires de Camargo, Zoilo. Identifying Paracoccidioides phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. Medical Mycology, 2015, 00, 1–8. doi: 10.1093/mmy/myv083
7. J. Shankar, T.D. Wu, K.V. Clemons, J.P. Monteiro, L.F. Mirels, D. Stevens. Influence of 17β-estradiol on gene expression of Paracoccidioides during mycelia-to-yeast transition. PLoS One., 6 (2011), p. e28402
8. Pato AM, Giusiano G, Mangiaterra. Paracoccidioidomicosis asociada a otras patologías respiratorias en un hospital de Corrientes, Argentina. M. Revista Argentina de Microbiología. 2007, 39: 161-165.
9. Tichellio AG, Mangiaterra M, Giusiano G Paracoccidioidomicosis en la Provincia de Formosa, Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 2008, 40: 24-29.
10. D. Pérez, J.A. Oviedo, D.L.S. Gill. Paracoccidioidomicosis: características clínicas de 94 casos. Rev Am Med Respir., 1 (2014), pp. 20-27
11. Giusiano, G; Rojas, F; Mussin, J; Alegre, L; Sosa, M. The Southern Endemic Zone of Paracoccidioidomycosis: Epidemiological Approach in Northeast Argentina. Current Fungal Infection Reports. 2018. https://doi.org/10.1007/s12281-018-0324-y
12. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. 2017. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. Fungal Genet Biol 106:9–25. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007.
13. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC,Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. Mol Phylogenet Evol 52:273–283. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.005
14. Roberto TN, de Carvalho JA, Beale MA, Hagen F, Fisher MC, Hahn C, de Camargo ZP, Rodrigues AM. 2021. Exploring genetic diversity, population structure, and phylogeography in Paracoccidioides species using AFLP markers. Stud Mycol 100:100131. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100131

ABSTRACT

Argentina has two endemic areas of paracoccidioidomycosis (PCM), one in the northwest (NOA) characterized by high incidence of juvenile type PCM and the most extensive area in the northeast of the country (NEA), where the chronic clinical form predominates. This study aimed to describe the molecular epidemiology of *Paracoccidiodes* spp. and relate this to clinical data. The 22 isolates of Paracoccidioides sp were recovered between 2013 and 2020 from the multicentric study of PCM in Argentina.

They were genotyped by tub1-PCR-RFLP and then sequenced through the study of 3 genomic regions (gP43, ARF, α tub). The results showed that 100% of the isolates are *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto* (S1) and that it is constituted by 2 populations S1a and S1b. The clinical and epidemiological characteristics of these patients with PCM showed a statistically significant relationship between the S1b subgenotype and the ganglion presentation. In addition, it was observed that the S1a subgenotype predominated in the NEA region.

This study suggests that *P. brasiliensis sensu stricto* (S1) is the predominant species in Argentina, it is necessary to expand the number of strains studied to generalize the results obtained in this work.

DETERMINACIÓN DE UN PERFIL MOLECULAR DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA DEFICIENTE (HRD) COMO MARCADOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A DOXORRUBICINA EN CÁNCER DE MAMA

Mayra Lis Sottile Fleury, Laura Vargas Roig,
Laura Constanza Gómez, Analía Redondo

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU). Centro Científico Tecnológico (CCT) - CONICET Mendoza

INTRODUCCIÓN

El **cáncer de mama** (CM) es una enfermedad de elevada incidencia en Argentina con 22.024 nuevos casos por año siendo la primera causa de muerte por tumores en mujeres en nuestro país (5.894 muertes por año) [Instituto Nacional del Cáncer]. Según cuáles sean los factores que determinan su aparición, los tumores malignos se clasifican en esporádicos, familiares y hereditarios. Los tumores esporádicos son los más frecuentes (70-75%), ocurren en personas que no presentan antecedentes familiares y constituyen casos aislados. El 20-25% de los tumores son familiares, en los que los factores genéticos actúan en conjunto con el ambiente, siendo importante la influencia de hábitos de vida tales como la alimentación, lo que hace a los miembros de una familia más susceptibles a desarrollar la enfermedad. Los casos restantes, 5-10%, corresponden a tumores hereditarios, que se producen por mutaciones heredables en los genes ***BRCA1*** y ***BRCA2*** [Apostolou P, Fostira F*, Biomed Res Int*. 2013].

Los genes supresores tumorales *BRCA1* y *BRCA2* codifican proteínas que son componentes claves del sistema de reparación del ADN por **recombinación homóloga (RH)**, mecanismo encargado de corregir las rupturas de doble cadena (RDC) de forma precisa [Roy R et al. *Nat Rev Cancer.* 2011]. Las RDC constituyen una de las alteraciones del ADN más tóxicas para la célula y, si no son reparadas correctamente, pueden dar lugar a translocaciones cromosómicas y promover la tumorigénesis [Kass E, Jasin M, *FEBS Lett.* 2010].

Además de los casos de CM hereditario, se han descripto tumores esporádicos que presentan defectos en la vía de RH, y que comparten características moleculares, histológicas y clínicas con aquellos tumores familiares que presentan mutación en genes *BRCA* [Lord CJ, Ashworth A. *Nat Rev Cancer*. 2016]. Por ejemplo, aquellos tumores esporádicos deficientes en *BRCA1* (por metilación del promotor o inactivación transcripcional) suelen presentar un fenotipo TN [Turner NC *et al. Oncogene*. 2007; Lips EH *et al. Br. J. Cancer.* 2013]. Mientras que aproximadamente el 70% de los casos de CM causado por mutaciones germinales en *BRCA1* y el 20% de los casos causados por mutaciones en *BRCA2*, corresponden también al subtipo molecular TN [Mavaddat N. *et al. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*.2012].

La **doxorrubicina** (aprobada por la FDA en 1974) continúa siendo una droga de primera línea en CM. Pertenece a la familia de las antraciclinas y su toxicidad es mediada por: 1) la inhibición de topoisomerasa II (con producción directa de RDC), 2) la generación de especies reactivas de oxígeno (con inducción de rupturas de simple cadena, entre otros daños) y 3) la inhibición de la síntesis del ADN [Zunino F, Capranico G. *Anticancer Drug Des*. 1990].

Desde hace tiempo nuestro laboratorio se ha enfocado en la búsqueda de marcadores que permitan predecir la respuesta individual a la quimioterapia basada en antraciclinas. Rodríguez A y colaboradores han propuesto que una firma molecular asociada a la deficiencia en la reparación del ADN podría diferenciar tumores de mama sensibles a antraciclinas [*Breast Cancer Res Treat*. 2010]. En ese contexto, nuestro grupo de trabajo ha estudiado la expresión de las proteínas APE1 (del sistema de reparación de escisión de bases) y MSH2 y MLH1 (del sistema de reparación de bases mal apareadas) en biopsias de carcinomas mamarios tratados con terapia neoadyuvante basada en antraciclinas. Sin embargo, la expresión de estas proteínas no se correlacionó con la respuesta clínica/patológica ni con la evolución de la enfermedad. Hilton y colaboradores observaron una tendencia entre la baja expresión de BRCA1 en tumores mamarios y la respuesta patológica completa a la quimioterapia administrada (doxorrubicina y ciclofosfamida seguida de docetaxel) [*Oncol Lett.* 2012]. Además, se ha descripto que defectos en otras proteínas distintas de BRCA1/2 pueden resultar en **deficiencia de recombinación homóloga (HRD)**, aunque aún no está dilucidado el conjunto de genes o proteínas (firma molecular) indicadoras del perfil HRD [Jacot W et al. *Future Oncol*. 2015]. **CtIP** es una proteína que participa en la etapa inicial de la vía de RH, interactúa con BRCA1, y tiene como función la resección de los extremos de las RDC. Se ha descripto que las mutaciones en *BRCA1* que interrumpen la interacción con CtIP se asocian con progresión tumoral [De Nicolo A et al. *Cancer Res*. 2009]. Interesantemente, se ha reportado que el complejo CtIP-BRCA1 tiene un rol en la eliminación de los polipéptidos unidos covalentemente en los extremos del ADN como consecuencia del tratamiento con inhibidores de topoisomerasa II, facilitando los pasos siguientes de la reparación [Nakamura K et al. *Plos Genet*. 2010]. Aún así, el rol de CtIP como marcador pronóstico/predictivo en CM no ha sido muy estudiado y los resultados son controvertidos [Soria-Bretones I et al. *Cancer Med.* 2013]. Sería sumamente importante determinar si la expresión de CtIP, BRCA1 y BRCA2 modula la efectividad de la doxorrubicina en carcinomas mamarios. El hallazgo del perfil molecular que identifique aquellos pacientes que se beneficiarían de la quimioterapia basada en antraciclinas constituiría una importante herramienta para optimizar el tratamiento oncológico en CM. En base a lo expuesto anteriormente, proponemos como **objetivo**: **Determinar si la expresión tumoral de las proteínas CtIP, BRCA1 y BRCA2 constituye una firma molecular que permite predecir la respuesta a doxorrubicina en pacientes con cáncer de mama.**

METODOLOGÍA

La hipótesis de trabajo es que *la expresión de CtIP, BRCA1 y BRCA2 en carcinomas mamarios invasores puede constituir una firma molecular con valor pronóstico y/o predictivo.* Para poner a prueba esta hipótesis se determinó por inmunohistoquímica la expresión de las proteínas CtIP1 y BRCA1 en muestras incluidas en parafinas de pacientes con CM que recibieron en su esquema terapéutico monoquimioterapia neoadyuvante con doxorrubicina.

Pacientes.

En este estudio retrospectivo se utilizaron muestras de 35 pacientes con CM localmente avanzado, procedentes del Hospital Luis Lagomaggiore de la provincia de Mendoza, que fueron reclutadas entre noviembre de 1997 y diciembre de 2005. El criterio de selección de los pacientes fue el siguiente: diagnóstico histológico y/o citológico de carcinoma de mama invasor, edad ≥18 años, no haber recibido quimioterapia o radioterapia anteriormente, niveles séricos de bilirrubina <0,5 mg/dl, niveles séricos de creatinina <1,5 mg/dl, función cardíaca normal. La Tabla 1 resume las principales características de las pacientes que se incluyeron en este trabajo. El protocolo de estudio y el consentimiento informado para pacientes fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación y el Comité de Ética en Investigación del Hospital Luis Lagomaggiore de acuerdo con los postulados de la Declaración de Helsinki. Además, el protocolo de estudio cuenta con la certificación de vigencia por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo.

Las biopsias que se estudiaron fueron obtenidas antes y después de la administración de monoquimioterapia neoadyuvante con doxorrubicina (DOX). El tratamiento consistió en 4 ciclos de 75 mg/m^2 de doxorrubicina antes de la cirugía y 6 ciclos de CMF (ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo) luego de la cirugía. Las biopsias fueron fijadas en formol buffer al 10% e incluidas en parafina.

La respuesta clínica fue evaluada considerando el tamaño tumoral existente luego de la administración de la quimioterapia neoadyuvante (antes de realizar la cirugía). Se consideró: Progresión tumoral al incremento de al menos 25% del tamaño tumoral, Enfermedad estable a un incremento <25% de la masa tumoral o reducción ≤50%, Respuesta parcial a la disminución >50% y Respuesta Completa a la desaparición del tumor.

La respuesta patológica se consideró como Completa: cuando no se observó carcinoma invasor; Enfermedad Residual microscópica cuando se observó <1 mm de carcinoma invasor y Enfermedad Residual macroscópica cuando se observó ≥ 1 mm de carcinoma invasor o múltiples focos.

Evolución de la enfermedad.

Se realizó periódicamente el seguimiento clínico de las pacientes. También se utilizaron herramientas de imágenes diagnósticas (rayos X, etc) para evaluar la evolución de la enfermedad. La evolución promedio de las pacientes fue de 67 meses (rango, 12-202 meses). La supervivencia global (SG) se calculó como el periodo desde el momento del diagnóstico hasta la fecha de fallecimiento. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se calculó como el periodo desde el diagnóstico hasta la fecha de metástasis.

Inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descripto por nuestro grupo de trabajo (*Gómez LC et al., J Clinical Pathology 2018*). La recuperación antigénica para la detección de las proteínas se realizó por ebullición durante 30 minutos en 0,01 M buffer citrato, pH 6. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-CtiP (1:200, ab117722, Abcam) y anti-BRCA1 (1:500 ab191042). Luego de los lavados con PBS 1X, los preparados se incubaron con el anticuerpo secundario y el reactivo ABC (Vectastain, Vector, USA). La inmunotinción se realizó con 0,5 mg/mL de diaminobencidina/0,01% de peróxido de hidrógeno como sustrato cromógeno y la contratinción se efectuará con Hematoxilina de Harris. Los preparados fueron examinados utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 (Japan) y un objetivo de 40X. La evaluación se realizó de acuerdo a la proporción de células con tinción positiva utilizando el siguiente score: <1%=0, 1-10%=1, 11-30%=2, 31-66%=3 y >66%=4.

Es importante mencionar que no se pudo realizar la inmunohistoquímica de BRCA2. Las empresas representantes en Argentina de los laboratorios que fabrican el anticuerpo contra BRCA2 cotizaron el valor del mismo a un precio equivalente al monto total del presente subsidio.

Análisis estadístico.

Las diferencias estadísticas entre los marcadores en las muestras pre y post quimioterapia se calcularon mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas. Se utilizó el test de Fisher para determinar la asociación entre la expresión de los marcadores y la respuesta clínica y patológica de las pacientes. La supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global fueron analizadas con el Método de Kaplan-Meier (GraphPad PRISM versión 6.0, San Diego, CA, USA). La diferencia entre las curvas fue evaluada mediante el test de Mantel-Cox (log-rank). Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p<0,05$.

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio

Característica	**N°**	**%**
	35	**100**
Edad (años)		
Mediana	53	
Rango	31-68	
Tamaño Tumoral		
T2	8	22,9
T3	23	65,7
T4	4	11,4
Metástasis a ganglio linfático		
N0	11	31,4
N1-N3	24	68,6
Subtipo Molecular		
Luminal A	2	5,8
Luminal B	13	37,1
HER-2	7	20,0
Triple Negativo	13	37,1
Histología		
Ductal	30	85,7
Lobulillar	3	8,6
Medular	1	2,85
Mucinoso	1	2,85
Evolución (meses)		
Media	67	
Rango	12-202	

RESULTADOS

Expresión de CtIP en tumores de mama obtenidos antes y después de la quimioterapia neoadyuvante con doxorrubicina.

CtIP es una proteína nuclear que participa en el mecanismo de reparación del ADN por Recombinación Homóloga. Actúa en las etapas iniciales de esta vía de reparación, remodelando los extremos de las RDC e interactuando con BRCA1. La doxorrubicina es un fármaco que tiene como blanco terapéutico la molécula de ADN, causando daños que requieren el funcionamiento del mecanismo de RH para su correcta reparación.

Las pacientes incluidas en este trabajo tienen como particularidad un esquema terapéutico basado en la administración de monoquimioterapia neoadyuvante. Esto implica que el estudio de la biopsia diagnóstica y de la pieza quirúrgica nos permite evaluar el efecto inducido por el único fármaco administrado, la doxorrubicina.

Los estudios inmuhistoquímicos realizados en la biopsia diagnóstica de carcinomas mamarios y en la muestra procedente de la tumorectomía, nos permitieron demostrar una reducción estadísticamente significativa ($p<0,01$) en los niveles de expresión tumoral de CtIP luego de la administración de la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas (Figura 3.1).

Se estudió la asociación entre la expresión tumoral de CtIP y la respuesta clínica y patológica de las pacientes. Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

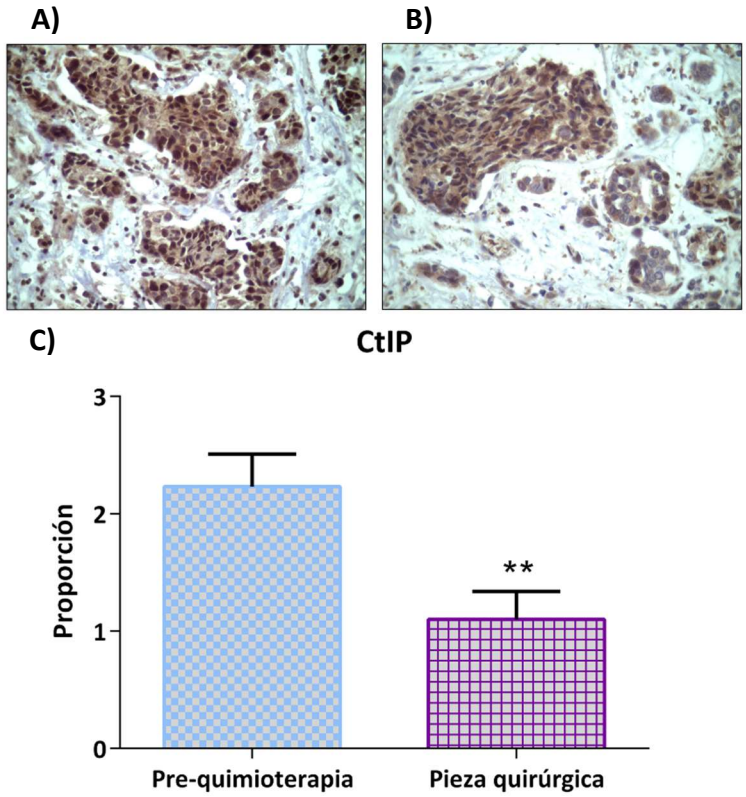


Figura 3.1. Expresión de BRCA1 en tumores de mama obtenidos antes y después de la quimioterapia neoadyuvante con DOX. **A)** Imagen representativa de la inmunotinción de CtIP en tumor de mama antes de la quimioterapia y **B)** después de la quimioterapia. **C)** Cuantificación de la inmunohistoquímica de CtIP según la proporción de células con tinción positiva. Las barras representan la media±error estándar. Se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas.

Expresión tumoral de CtIP y su correlación con la evolución de las pacientes con cáncer de mama.

Se realizaron curvas de Kaplan Meier para determinar si existían relaciones entre la expresión tumoral de CtIP en las muestras obtenidas antes y después de la quimioterapia con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. Se utilizó como cut-off un score de 2, correspondiente a una expresión de este marcador mayor al 10% de las células tumorales, como se describió en la metodología.

Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, observamos una tendencia (p=0,06) en aquellas pacientes con mayor supervivencia global, quienes mostraron una baja expresión tumoral de CtIP en la biopsia obtenida antes de la quimioterapia (Figura 3.2.1).

Asimismo las pacientes con mayor supervivencia libre de enfermedad mostraron una baja expresión de CtIP en el tumor primario, aunque estos datos no fueron estadísticamente significativos (Figura 3.2.1).

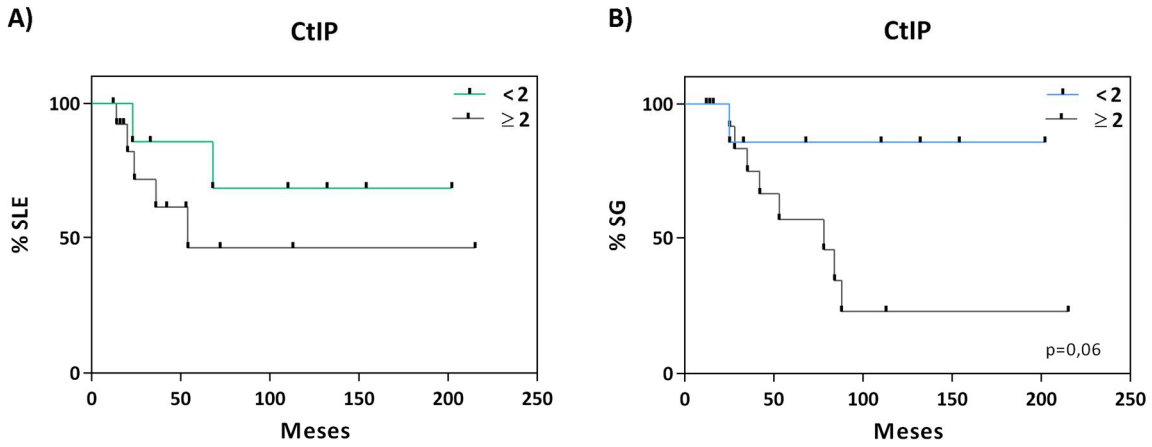


Figura 3.2.1. Curvas de supervivencia para la expresión de CtIP en el tumor primario. A) Curva de supervivencia libre de enfermedad y **B)** Curva de supervivencia global en función de la expresión de CtIP en tumores de mama obtenidos antes de la quimioterapia neoadyuvante. Se utilizó el test log-rank para evaluar las diferencias entre las curvas de sobrevida.

No se observaron asociaciones entre la supervivencia global y libre de enfermedad de las pacientes y la expresión de CtIP en los tumores mamarios obtenidos luego de la quimioterapia basada en doxorrubicina (Figura 3.2.2).

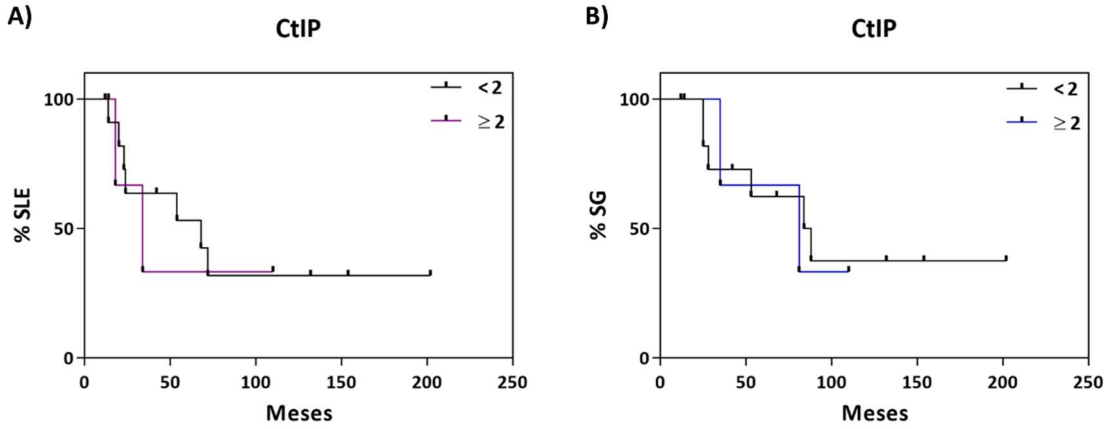


Figura 3.2.2. Curvas de supervivencia para la expresión de CtIP en el tumor obtenido luego de la administración de la quimioterapia con DOX. A) Curva de supervivencia libre de enfermedad y **B)** Curva de supervivencia global en función de la expresión de CtIP en tumores de mama obtenidos luego de la quimioterapia neoadyuvante basada en doxorrubicina. Se utilizó el test log-rank para evaluar las diferencias entre las curvas de sobrevida.

Expresión de BRCA1 en tumores de mama obtenidos antes y después de la quimioterapia neoadyuvante con doxorrubicina.

BRCA1 es una proteína clave del sistema de reparación del ADN por RH. Las mutaciones patogénicas en el gen *BRCA1* presentes en la línea germinal son las responsables del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

Se evaluó la expresión de la proteína BRCA1 en la biopsia diagnóstica de carcinomas mamarios y en la muestra procedente de la tumorectomía mediante inmunohistoquímica (Figura 3.3.A y B). Se observó un incremento en los niveles de expresión tumoral de BRCA1 en la muestra obtenida luego de la administración de la quimioterapia basada en

doxorrubicina en relación a la muestra pre-quimoterapia. Sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Figura 3.3.C).

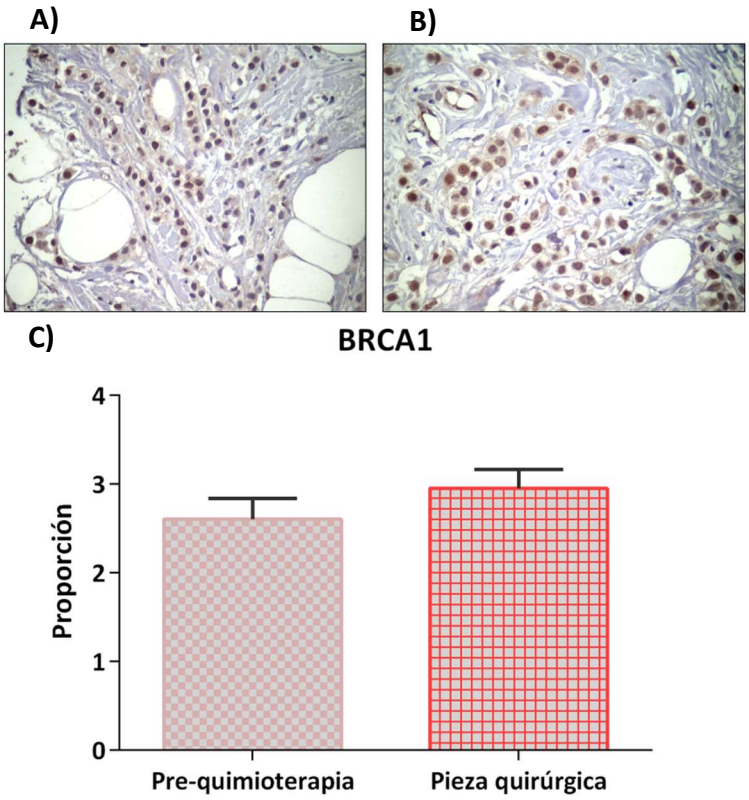


Figura 3.3. Expresión de BRCA1 en tumores de mama obtenidos antes y después de la quimioterapia neoadyuvante con DOX. A) Imagen representativa de la inmunotinción de BRCA1 en tumor de mama antes de la quimioterapia y **B)** después de la quimioterapia. **C)** Cuantificación de la inmunohistoquímica de BRCA1 según la proporción de células con tinción positiva. Las barras representan la media ±error estándar. Se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas.

Expresión tumoral de BRCA1 y su correlación con la evolución de las pacientes con cáncer de mama.

Se evaluó si existe relación entre la expresión tumoral de BRCA1 en los carcinomas estudiados y la evolución de la enfermedad de las pacientes con cáncer de mama mediante las curvas de supervivencia de Kaplan Meier. Al igual que para la proteína CtIP, se utilizó como cut-off un score de 2.

El análisis de las curvas de supervivencia no evidenció asociaciones entre la supervivencia global y libre de enfermedad de las pacientes y la expresión de BRCA1 en los tumores de mama obtenidos antes de la quimioterapia (Figura 3.4.1).

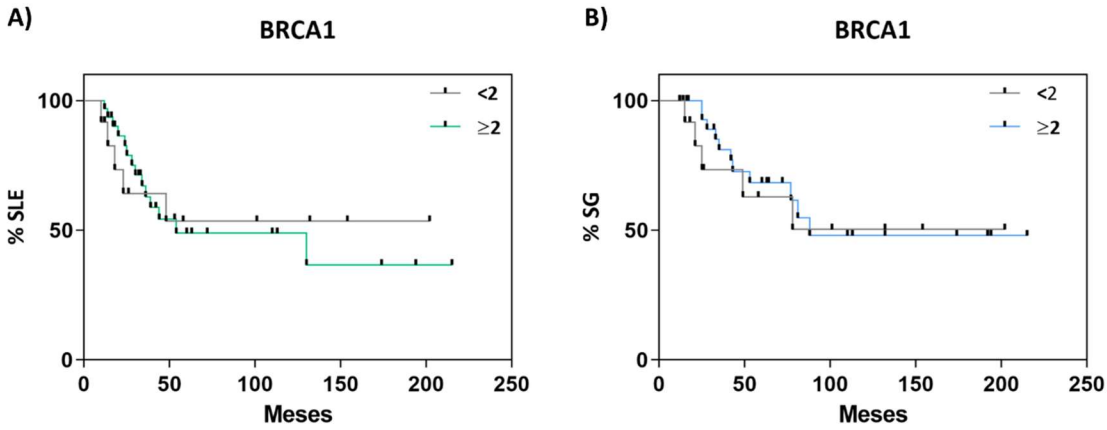


Figura 3.4.1. Curvas de supervivencia para la expresión de BRCA1 en el tumor primario. A) Curva de supervivencia libre de enfermedad y **B)** Curva de supervivencia global en función de la expresión de BRCA1 en tumores de mama obtenidos antes de la quimioterapia neoadyuvante. Se utilizó el test log-rank para evaluar las diferencias entre las curvas de sobrevida.

Cuando se estudió la relación entre la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama y la expresión tumoral de BRCA1 en la pieza quirúrgica, se observó que aquellas pacientes con mayor supervivencia libre de enfermedad mostraron una expresión tumoral de BRCA1 mayor al 10%. Estos datos fueron estadísticamente significativos (Figura 3.4.2.A).

Del mismo modo, una mejor supervivencia global de las pacientes con cáncer de mama se asoció significativamente con una mayor expresión tumoral de BRCA1 luego de la administración de la quimioterapia neoadyuvante con doxorrubicina. (Figura 3.4.2.B).

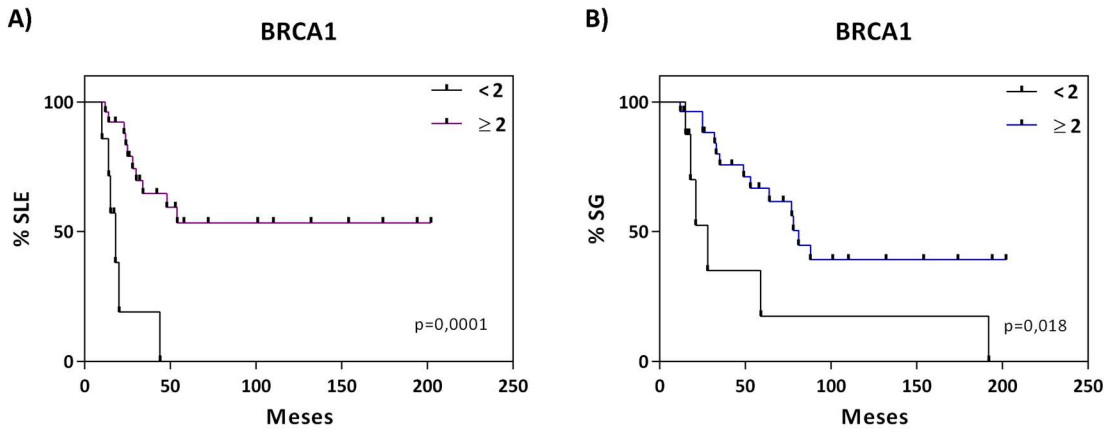


Figura 3.4.2. Curvas de supervivencia para la expresión de BRCA1 en el tumor obtenido después de la administración de la quimioterapia con DOX. A) Curva de supervivencia libre de enfermedad y **B)** Curva de supervivencia global en función de la expresión de BRCA1 en tumores de mama obtenidos luego de la quimioterapia neoadyuvante. Se utilizó el test log-rank para evaluar las diferencias entre las curvas de sobrevida.

Estos resultados sugieren que el estudio de la expresión tumoral de BRCA1 podría ser útil como marcador pronóstico en aquellas pacientes que reciben doxorrubicina en su esquema terapéutico.

Se ha reportado que la expresión de las proteínas de reparación del ADN varía entre los tumores de mama. En consecuencia, el funcionamiento de los mecanismos de reparación del ADN puede afectar la respuesta a la quimioterapia basada en fármacos que tienen a la molécula de ADN como blanco terapéutico [Rodríguez AA, *Breast Cancer Res Treat*. 2010; Madhusudan S, Middleton MR, *Cancer Treat Rev*. 2005].



Figura 3.4.4. Procesos celulares en los que participa BRCA1.

En este trabajo, una mayor expresión de BRCA1 se asoció con una mayor supervivencia de las pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas. Debido que el anticuerpo específico que se utilizó en este trabajo reconoce el dominio carboxilo terminal de BRCA1, la inmunodetección de BRCA1 puede asociarse con una proteína funcional.

Además de participar en el mecanismo de reparación del ADN por RH, la proteína BRCA1 cumple otras funciones en la célula [Takaoka M, Miki Y, *Int J Clin Oncol*. 2018] (Figura 3.4.3). En este caso, la implicancia de BRCA1 en el proceso de apoptosis y en el punto de control G2/M del ciclo celular, podrían explicar el mejor pronóstico de las pacientes que presentan mayor expresión tumoral de BRCA1.

CONCLUSIONES

La doxorrubicina es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de mama (CM). Sin embargo, una de las limitantes para su uso es la aparición de efectos no deseados y de resistencia a la quimioterapia. Por ello, marcadores que nos permitan predecir la respuesta de las pacientes al tratamiento y/o la evolución de la enfermedad constituirían una valiosa herramienta para la oncología.

Este proyecto nos ha permitido investigar la utilidad como marcadores predictivos y pronósticos de las proteínas del sistema de reparación del ADN por RH, CtIP y BRCA1, en biopsias de pacientes con cáncer de mama obtenidas antes y después de la administración de monoquimioterapia neoadyuvante con doxorrubicina.

El estudio por inmunohistoquímica de las proteínas de reparación del ADN en las biopsias diagnósticas y en aquellas procedentes de la tumorectomía, demostró que la quimioterapia neoadyuvante basada en doxorrubicina disminuyó significativamente la expresión tumoral de CtIP. En el caso de la expresión de BRCA1, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras tumorales obtenidas antes y después de la quimioterapia.

En este grupo de pacientes no se encontraron asociaciones entre la expresión tumoral de las proteínas de reparación BRCA1 y CtIP y la respuesta clínica y patológica a la quimioterapia neoadyuvante, descartando su potencial utilidad como marcadores predictivos de respuesta a la doxorrubicina.

Las curvas de supervivencia mostraron una tendencia (p=0,06) en aquellas pacientes con una baja expresión tumoral de CtIP (<10%) en la biopsia obtenida antes de la quimioterapia, quienes presentaron mayor supervivencia global. A pesar de esto, CtIP no tendría valor pronóstico en este grupo de pacientes con CM.

En las biopsias de CM obtenidas luego de la quimioterapia, la expresión de BRCA1 mayor al 10% se asoció significativamente con una mejor supervivencia global y libre de enfermedad de las pacientes. Nuestros resultados muestran que la expresión de BRCA1 podría tener utilidad como marcador pronóstico en pacientes con CM que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en doxorrubicina y que luego de la cirugía recibieron una terapia diferente (CMF). Es necesario validar estos resultados en estudios con un mayor número de pacientes con CM para confirmar el valor pronóstico que podría tener BRCA1, lo cual le brindaría al médico oncólogo información valiosa sobre la evolución de la enfermedad para poder implementar decisiones terapéuticas de manera temprana.

PUBLICACIONES EFECTUADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO.

Los resultados de este proyecto fueron presentados en la XXXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, realizada el 5 y 6 de diciembre de 2019 en San Luis, Argentina. El resumen (#70) fue publicado en inglés en la Revista Biocell 2020, Volumen 44, Suplemento 1, página 39.

"Prognostic value of BRCA1 in breast cancer patients treated with neoadjuvant antrhacycline-based chemotherapy".

Mayra L. Sottile, Laura C. Gómez, Analía L. Redondo, Pedro Daguerre, Marcela Leuzzi, Fernando Gago, Jorge Ibarra, Laura M. Vargas-Roig.

BIBLIOGRAFÍA

Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:747318. doi:10.1155/2013/747318

De Nicolo A, Parisini E, Zhong Q, et al. Multimodal assessment of protein functional deficiency supports pathogenicity of BRCA1 p.V1688del. *Cancer Res*. 2009;69(17):7030-7037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1440

Gomez LC, Sottile ML, Guerrero-Gimenez ME, et al. *TP73* DNA methylation and upregulation of ΔNp73 are associated with an adverse prognosis in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2018;71(1):52-58. doi:10.1136/jclinpath-2017-204499

Instituto Nacional del Cáncer; Ministerio de Salud de la Nación. Estadísticas - Incidencia | Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia

Instituto Nacional del Cáncer; Ministerio de Salud de la Nación. Estadísticas - Mortalidad | Argentina.gob.ar. https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad

Jacot W, Theillet C, Guiu S, Lamy PJ. Targeting triple-negative breast cancer and high-grade ovarian carcinoma: refining BRCAness beyond BRCA1/2 mutations?. *Future Oncol*. 2015;11(4):557-559. doi:10.2217/fon.14.268

Kass EM, Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett*. 2010;584(17):3703-3708. doi:10.1016/j.febslet.2010.07.057

Hilton J, Weberpals J, Lorimer I, et al. BRCA1 protein levels and PIK3CA mutations as predictive biomarkers for response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer: An exploratory analysis. *Oncol Lett*. 2012;4(1):141-145. doi:10.3892/ol.2012.697

Lips EH, Mulder L, Oonk A, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer*. 2013;108(10):2172-2177. doi:10.1038/bjc.2013.144

Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(2):110-120. doi:10.1038/nrc.2015.21

Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2005;31(8):603-617. doi:10.1016/j.ctrv.2005.09.006

Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(1):134-147. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0775

Nakamura K, Kogame T, Oshiumi H, et al. Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair. *PLoS Genet*. 2010;6(1):e1000828. Published 2010 Jan 22. doi:10.1371/journal.pgen.1000828

Rodriguez AA, Makris A, Wu MF, et al. DNA repair signature is associated with anthracycline response in triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(1):189-196. doi:10.1007/s10549-010-0983-z

Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):68-78. Published 2011 Dec 23. doi:10.1038/nrc3181

Soria-Bretones I, Sáez C, Ruíz-Borrego M, Japón MA, Huertas P. Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer. *Cancer Med*. 2013;2(6):774-783. doi:10.1002/cam4.141

Takaoka M, Miki Y. BRCA1 gene: function and deficiency. *Int J Clin Oncol*. 2018;23(1):36-44. doi:10.1007/s10147-017-1182-2

Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(14):2126-2132. doi:10.1038/sj.onc.1210014

Zunino F, Capranico G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des*. 1990;5(4):307-317

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women in Argentina. In 2019, the National Cancer Institute, Ministry of Health reported a total of 5,894 deaths caused by breast cancer. Anthracycline-based regimens represent the major chemotherapeutic agents used in breast cancer treatment. As DNA-damaging agent, doxorubicin (anthracycline) induces DNA single and double strands breaks which are repaired by homologous recombination (HR) mechanism. The expression of DNA repair proteins varies among breast tumors and the DNA repair status can affect the chemotherapy response. The aim of our work was to determine the predictive/prognostic value of HR proteins CtIP and BRCA1 in breast cancer patients treated with neoadjuvant doxorubicin monochemotherapy. BRCA1 and CtIP expression was evaluated by immunohistochemistry in pre- and postchemotherapy tumor biopsies (N=35) and compared with the tumor response and the patients´ follow-up. BRCA1 expression increased in tumor cells after doxorubicin administration although these results were not statistically significant. In contrast, CtIP expression significantly decreased in tumor biopsies after chemotherapy with doxorubicin. No associations were found between DNA repair proteins expression and the clinical and pathological response to neoadjuvant chemotherapy. However, BRCA1 expression (>10% of tumor cells) in the post-chemotherapy biopsies was associated with better disease-free survival and overall survival ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively). Our results indicate that BRCA1 expression may be a useful prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy followed by cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil. However, these results need to be replicated in larger studies to confirm the specific role of BRCA1 as prognostic molecular marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.

ANÁLISIS DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN IGHV, PRESENCIA DE RECEPTORES ESTEREOTIPADOS Y SUBCLONES DE VALOR PRONÓSTICO EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Carmen Stanganelli[1], Juana Cabrera[1], Marcela Sarmiento[2]

1-División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. 2- Servicio de Clínica Hematológica, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica crónica (LLC), es la neoplasia a células B maduras más frecuente en adultos de Occidente (1). Presenta un curso clínico altamente variable con una sobrevida que oscila entre unos pocos meses y más de una década a partir del diagnóstico. Los actuales sistemas de estadificación y los parámetros biológicos disponibles no resultan suficientes para predecir este comportamiento diferente. El estado mutacional de los genes IGHV (*immunoglobulin heavy chain variable región*) es uno de los más importantes factores pronóstico en LLC, habiendo permitido definir dos grupos con diferente curso clínico: pacientes con el gen mutado (M) (<98% de homología con respecto a la línea germinal, LG), asociados a buena evolución clínica, y aquellos con IGHV no mutado (NM) (con homología de 98% o superior), relacionados a progresión de la enfermedad (2, 3).

Diferentes estudios han demostrado la presencia de un repertorio sesgado de genes IGHV en LLC, así como la existencia de una fracción de pacientes que presentan BCRs (*B-cell receptors*) de alta homología, denominados estereotipados. Los mismos se encuentran agrupados en subsets definidos en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos (aa) de la región VH CDR3 (*variable heavy chain complementary-determining region 3*). En algunos casos, la presencia de BCRs estereotipados asignados a un subset determinado se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad, proporcionando información pronóstica adicional independientemente del estado mutacional o del gen IGHV involucrado (4, 5). Asimismo, la secuenciación de última generación (NGS; next generation sequencing) ha revelado la presencia de subclones de relevancia clínica, no detectables por la técnica de secuenciación convencional, en una cuarta parte de los pacientes con LLC (Stamatopoulos Leukemia 2017), contribuyendo a la heterogeneidad clínica de la enfermedad.

En este contexto, el objetivo de este estudio es analizar el estado mutacional, el patrón de IGHV y la expresión de BCRs estereotipados en pacientes con LLC tendiente a identificar los subsets más frecuentes presentes en nuestra serie. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con los rearreglos genómicos de la patología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes.

Se analizaron 102 pacientes (61 hombres: edad media: 65,75 años, rango: 36-87 años; estadíos RAI: 0: 37,5%, I-II: 48,6%, III-IV: 13.9%). Las muestras fueron derivadas al Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, y a la División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. El diagnóstico fue establecido de acuerdo con el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia Criteria (6). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Todos los individuos dieron su consentimiento informado.

Análisis del estado mutacional de IGHV.

Se efectuó extracción de ARN total a partir de células mononucleares de sangre periférica (SP) de pacientes y controles obtenidas con Ficoll-Hypaque, utilizando el método de Trizol-cloroformo seguido de una purificación con isopropanol. El ARN se cuantificó espectofotométricamente. La síntesis de ADNc total se efectuó por RT-PCR a partir de 0,5 µg de ARN usando random-primers (Biodynamics).

La amplificación del ADNc se realizó mediante seis reacciones de PCR, utilizando en cada caso un primer forward ubicado en la región VH FR1 consenso específico de cada familia VH (VH1-VH6) o en la región líder consenso (LH1-LH6) (7) y un primer antisentido JH (8). Las condiciones de ciclado fueron: 7 minutos a 95ºC, seguidos de 35 ciclos a 95ºC durante 45 segundos, 62ºC durante 45 segundos, 72ºC durante 1,30 minutos, alargamiento a 72ºC durante 10 minutos. Una vez que la familia involucrada en el rearreglo fue identificada, el producto de PCR fue purificado por extracción a partir del gel de agarosa al 1% y secuenciado en forma bidireccional (Figura 1 A y B). Las secuencias se compararon con la línea germinal utilizando las bases de datos IMGT-VQuest e Igblast, a fin de determinar los genes IGHV, IGHD e IGHJ responsables del rearreglo, el porcentaje de homología y el estado mutacional.

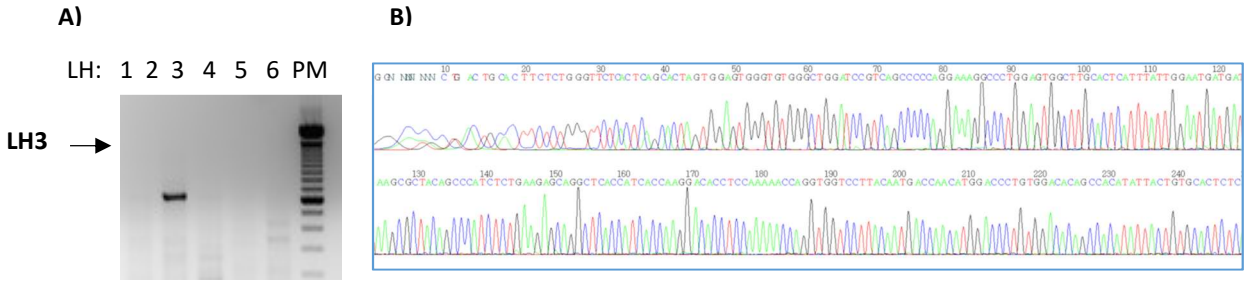


Figura 1: A) Gel de agarosa al 1% mostrando amplificación por PCR. PM: marcador de peso molecular. B) Secuenciación automática.

Análisis de la presencia de BCRs estereotipados.

Para el análisis de subsets, se alinearon las secuencias de aminoácidos (aa) de la región VH CDR3 entre los codones 107 y 117 con las secuencias de subsets previamente publicadas (9, 10) usando Clustal Ω. Se determinó el score de alineamiento múltiple (SAM) como el valor medio de todos los pares de alineamientos entre la secuencia incógnita y las secuencias del subset. Para la definición de subsets se utilizaron los

siguientes criterios: uso de los mismos rearreglos D-J, secuencias con una diferencia en longitud ≤3 aa, aún con genes IGHV distintos y SAM mayor o igual al 60%. Se utilizó además el criterio de Agathangelidis et al (2012) (11) para identificar subsets mayores, definidos como tales por ser los más frecuentes, por medio de la herramienta bioinformática ARResT/AssignSubsets. En este caso solo las secuencias reordenadas que portan genes IGHV del mismo clan (sea: I, II o III), pueden asignarse al mismo grupo. Dichas secuencias deben además tener: idénticas longitudes de la región VH CDR3, posiciones exactas de los aa compartidos dentro de esta región y poseer al menos el 50% de identidad y 70% de semejanza en los aa.

Análisis citogenético y FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

Se realizó estudio citogenético de linfocitos de sangre periférica, cultivados durante 72 hs a 37 ° C en medio F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino, estimulados con Pokeweed Mitogen y Oligo DSP30. Se utilizó la técnica de bandeo G y la nomenclatura establecida en el ISCN (International System for Human Cytogenetics Nomenclature) (2016) (12).

Para el análisis de FISH, los extendidos fueron hibridados con el panel de sondas de LLC: SE12, OLE13q14 (D13S319), OLE11q22.3 (ATM) y 17p13.1 (TP53) (LIVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina), de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Se analizaron doscientos núcleos interfásicos para cada sonda por individuo. Los puntos de corte para los valores positivos (media del control normal + 3 desviaciones estándar), determinados a partir de diez individuos normales fueron los siguientes: 3%, 10%, 7,5% y 5,5%, para trisomía 12, deleciones de D13S319, ATM y TP53, respectivamente. (13).

Análisis estadístico.

La comparación de los datos de los pacientes se efectuó empleando el test de Mann-Whitney. El análisis de las variables clínicas y de laboratorio se realizó utilizando el test `t´ de Student (para las variables cuantitativas) y la prueba de Chi cuadrado o el Test Exacto de Fisher (para variables categóricas). Para todas las evaluaciones se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$. Los resultados se analizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics 24.

RESULTADOS

En el presente estudio efectuamos el análisis del perfil mutacional de los genes IGHV de 102 pacientes con LLC. Entre ellos, 63 casos (60,6%) resultaron M mientras que los 41 restantes (39,4%) fueron NM. Dos pacientes presentaron doble rearreglo NM, lo cual genera un total de 104 rearreglos observados. Asimismo, entre los casos NM el 25% de las secuencias fueron completamente NM (100% homología con la LG). La media de edad fue mayor para los pacientes con LLC M (67,3 años) respecto de los NM (63,3 años), observándose una similar distribución por sexo en ambos grupos. La distribución por estadios Rai mostró una mayor proporción de casos en estadio 0 en las LLC M (40,3%) respecto de las NM (17,1%).

Con respecto a las familias IGHV, encontramos que IGHV3 fue la más frecuentemente utilizada en nuestra serie (44,2% de los casos), seguida por IGHV4 (24.0%), IGHV1 (22,1%), IGHV2 (3,8%), IGHV5 (2,9%), IGHV7 (1,9%) e IGHV6 (1,0%). En las familias IGHV3 e IGHV4 se encontró un predominio de los casos M (66,7% y 75%, respectivamente). En contraste, se detectó un 76,5% de pacientes con IGHV1 entre las LLC NM.

En referencia al uso de los genes IGHV, en nuestra serie encontramos representados 39 de los 42 segmentos funcionales descriptos (14). El segmento más frecuente fue IGHV1-69 (10%) seguido por IGHV3-23 e IGHV4-34 (9,4% cada uno), IGHV3-21 (6,7%), IGHV3-48 e IGHV4-59 (4,8% cada uno) (Figura 2). Asimismo, se pudo observar que el gen IGHV1-69 se encontró asociado al estado NM en 94,4% de los casos, todos con 100% de homología, mientras que IGHV4-34 se asoció al estado M en 88,8% de los casos.

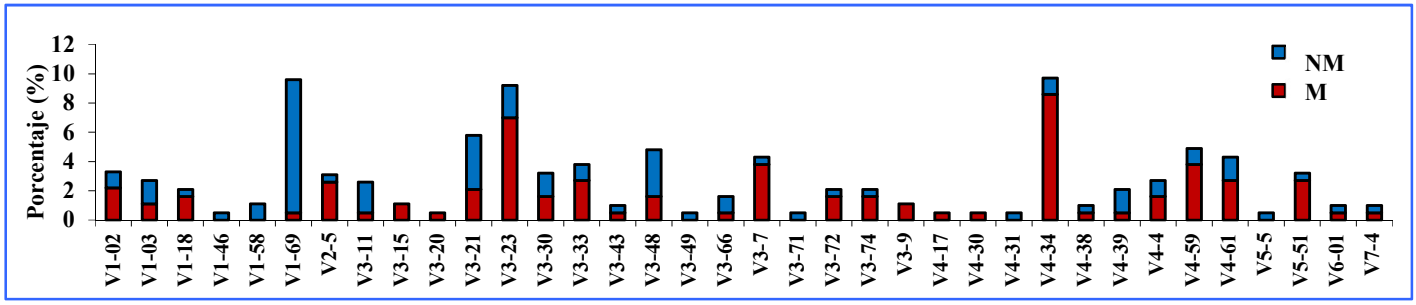


Figura 2: Uso de los genes IGHV en la cohorte analizada.

El análisis de las familias IGHD mostró la siguiente distribución: IGHD3 (39,6%), IGHD2 (17,8%), IGHD5 (15,9%), IGHD6 (13,9%), IGHD4 (6,9%) e IGHD1 (5,9%). Asimismo, 22 de los 26 diferentes segmentos IGHD (14) fueron expresados en nuestros casos, siendo el más representados IGHD3-22 (14,4%), seguido por IGHD3-3 (11,5%), IGHD3-10 (8,7%) e IGHD6-19 (6,7%). Con respecto a los segmentos IGHJ, el más frecuentemente utilizado fue IGHJ4 (38,0%), seguido de IGHJ6 (30,8%), IGHJ3 (14,4%), IGHJ5 (10,3%) e IGHJ1 (5,2%) e IGHJ2 (0,9%). Entre los pacientes M, el segmento IGHJ4 fue el mayormente expresado (46,1%) mientras que IGHJ6 se encontró más representado en los casos NM (41,5%). Asimismo, el gen IGHJ4*02 (33,7%) fue el más comúnmente utilizado en nuestra serie, seguido de IGHJ6*02 (29,8%).

Se efectuó el análisis de las secuencias aminoacídicas de los segmentos VH CDR3 para la búsqueda de BCRs estereotipados, los resultados se detallan en la Tabla 1. Esta evaluación mostró la presencia de 13,5% (14/104) BCRs estereotipados; 11,5% (12 casos) corresponden a subsets mayores. El subset #2 fue el encontrado con mayor frecuencia (3,8%), seguido por subset #4 (2,9%), subsets #1 y #16 (1,9% cada uno) y subsets #3 y #8 (1%). El gen IGHV1-69 mostró la presencia de BCRs estereotipados en 2/10 casos (20%) correspondientes a los subsets #1 y #3. Con referencia al gen IGHV4-34 se lo encontró estereotipado en 5/9 (55,6%) pacientes asignados a los subsets #4 y #16, mientras que IGHV3-21 se halló estereotipado en 4/7 casos (57,1%), correspondientes al subset #2.

Tabla 1: Análisis de la presencia de BCRs estereotipados en los pacientes con LLC

Caso Nº	IGHV	IGHD	IGHJ	% homología	Estado mutacional	Stanmatopoulos/ Bomben (SAM)	Agathangelidis Subsets mayores
2	3-21*01	-	J6*02	96,8	M	2 (82,1)	2
11	3-21*01	-	J6*02	98,5	NM	-	2
15	4-34*01	2-15*01	J6*02	88,0	M	16 (68,2)	16
16	4-34*01	5-18*01	J6*02	92,4	M	4 (64,3)	4
23	1-3*01	6-19*01	J4*02	100	NM	1 (63,6)	1
24	1-69*01	3-3*01	J6*02	100	NM	7 (71)	-
36	3-21*01	-	J6*02	96,5	M	2 (82,1)	2
37	4-34*01	4-17*01	J6*02	93,0	M	-	4
38	4-34*01	5-18*01	J6*02	91,0	M	16 (68,2)	16
80	1-2*02	6-19*01	J4*02	100	NM	1 (67,6)	-
82	4-39*01	6-13*01	J5*02	98,9	NM	8 (74,8)	8
83	1-69*01	2-2*01	J6*02	99,5	NM	3 (73,5)	3
84	4-34*01	1-26*01	J6*02	91,2	M	-	4
94	3-21*01	-	J6*02	98,5	M	2 (68,8)	2

M: mutado, NM: no mutado, SAM: Score de alineamiento múltiple

En relación al estudio citogenético, el mismo se efectuó en 59 casos observándose una distribución similar de cariotipos anormales entre los pacientes M (76,3%) y NM (79,8%). No obstante, al analizar el tipo y cantidad de anomalías, detectamos que los casos NM presentaban mayor número de alteraciones por cariotipo que los pacientes M (3,3 y 2,1, respectivamente), en tanto que se observó un mayor porcentaje de translocaciones desbalanceadas en los NM (33%), respecto de los casos M (20%).

Asimismo, el análisis por FISH se realizó en 51 casos entre los cuales el 49% mostraron deleción 13q14 (26% de ellos con deleción bialélica), 26,5% trisomia 12, 15,2% deleción 17p13 y 10,9% deleción 11q22. La incidencia total de aberraciones fue similar en los casos M y NM (76,3% y 79,8%, respectivamente). Sin embargo, se observó una mayor proporción de deleción 13q14, como única anomalía en los pacientes con LLC M (48%) respecto de los casos con LLC NM (21%). El análisis de la distribución de alteraciones genómicas en cada grupo mostró que los pacientes con LLC M presentaban una proporción significativamente mayor de deleción 13q14 como única anomalía respecto de los casos con trisomía 12 (12%) (p=0,003) y con deleción 17p/11q (11,7%) (p=0,003) (Figura 3).

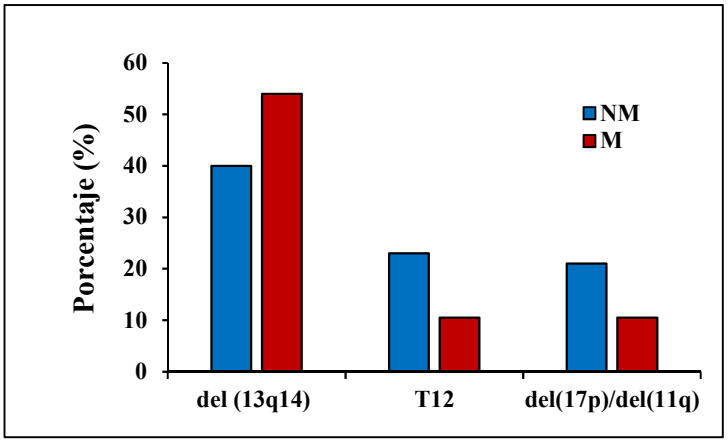


Figura 3: Distribución de alteraciones genómicas por FISH entre pacientes IGHV M y NM. Diferencias significativas: *deleción 13q14 como única anomalía vs trisomía 12 (T12) y del17p13/del11q22 (p=0,003).

DISCUSIÓN

El análisis del repertorio de genes IGHV en LLC ha demostrado estar sesgado tanto a nivel de las familias como de los genes utilizados. Nuestros resultados mostraron un 60,6% de casos M y un 39,4% de NM, frecuencias similares a las publicadas para otras poblaciones (15, 9), confirmando que, en al menos la mitad de los casos, los genes IGVH poseen un número relevante de mutaciones somáticas. La distribución por familia VH evidenció el siguiente esquema: VH3>VH4>VH1, diferente a la reportada en países occidentales que presentaron VH3>VH1>VH4 (11). Si bien el orden de frecuencias de Argentina es igual al de países asiáticos, varían las proporciones, encontrándose más representada en China la familia VH4 y menos la VH1 respecto de Argentina. La comparación de los genes IGHV con los datos de otras regiones geográficas, permitió observar que nuestros resultados son similares a la distribución de países europeos con IGHV1-69 como el más frecuente (11) pero muy distinto a los países Asiáticos particularmente para los genes IGHV1-2 e IGHV1-69 que mostraron frecuencias mucho menores a las nuestras (16). Estos hallazgos en pacientes no relacionados y/o geográficamente distantes, sustentan la selección y expansión clonal de las células

leucémicas mediante la participación de estímulos antigénicos específicos que influirían en la patogénesis y las características clínico-biológicas de la enfermedad.

La presencia de aberraciones genómicas y el estado mutacional de IGHV son considerados como importantes factores de riesgo en esta patología. Si bien no observamos diferencias en la distribución de cariotipos normales y anormales entre pacientes M y NM, encontramos que los casos con LLC NM presentaban mayor número de alteraciones por cariotipo así como un porcentaje más alto de translocaciones desbalanceadas, indicando un mayor nivel de inestabilidad genómica. Datos de la literatura muestran un peor pronóstico para los pacientes con alteraciones citogenéticas en el cariotipo, particularmente cariotipos complejos (17) en tanto que un estudio reciente (18) detecta que la presencia de cariotipos complejos de alto riesgo (≥5 aberraciones) se asocia a muy mal pronóstico, independientemente de otros factores de riesgo.

En cuanto a la correlación con los datos de FISH, encontramos una asociación significativa entre la del(13)(q14) y la presencia de IGHV M, sustentando el pronóstico favorable de ambos parámetros, y confirmando resultados previos de la literatura (19, 20) que indican una distribución diferente de rearreglos genómicos entre los pacientes con LLC M y NM.

Con respecto a los BCRs estereotipados, los mismos fueron observados en el 13,5% de los casos. El porcentaje de casos de LLC con BCRs estereotipados varía entre 12,5 y 32% en las cohortes publicadas (21, 22), encontrándose frecuencias del 20-30% en las series de mayor tamaño (5). En nuestra cohorte el subset #2 fue el más frecuente, seguido por el subset #4, y luego los subsets #1 y #16, en tanto que datos europeos muestran un orden de frecuencias de subset #2> subset #1> subset #4 (11). La detección de estos receptores refuerza la hipótesis de la presencia de estímulos antigénicos o epitopes estructuralmente similares, en el desarrollo y la patogénesis de la LLC.

En cuanto a la evolución clínica, los subsets #1 y #7 se encontraron preferentemente asociados a LLC NM, relacionada a mal pronóstico (9, 10). En concordancia con estos datos, el paciente de nuestra serie correspondiente al subset #7 mostró enfermedad progresiva y presentó anemia hemolítica autoinmune, complicación más frecuentemente asociada al subset #3 (23). Asimismo, resulta interesante referir que los pacientes con IGHV4-39 esterotipado fueron reportados con alta agresividad clínica asociada a infecciones recurrentes y evolución a Síndrome de Richter o la ocurrencia de neoplasias secundarias (24), datos que concuerdan con lo observado en nuestro único caso con transformación a Richter que mostró expresión de IGHV4-39 y fue NM.

Es importante destacar que en nuestra cohorte el segmento IGHV3-21 presentó una frecuencia de 6,7% (7/104). Este gen fue observado en alta frecuencia en pacientes escandinavos (25, 26), siendo de baja incidencia en grandes cohortes de USA y de la región mediterránea (27, 28). Asimismo, resulta interesante remarcar que en nuestra cohorte 55,6% de los pacientes con IGHV3-21 correspondieron a subset #2, este hallazgo es relevante dado que solo los IGHV3-21 subset #2 son uniformemente agresivos, mientras que los rearreglos IGHV3-21 heterogéneos (no estereotipados) presentan un pronóstico que depende de su estado mutacional (4).

En conclusión, hemos estudiado los rearreglos IGHV en pacientes Argentinos con LLC encontrando una distribución sesgada en el uso de los genes IGHV coincidente con datos reportados en poblaciones occidentales, sugiriendo la relevancia de estímulos antigénicos específicos en la patogénesis y las características clínico-biológicas de la enfermedad y/o la influencia de factores ambientales. Estos resultados constituyen un aporte a la caracterización biológica de nuestros pacientes con LLC.

RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la neoplasia a células B maduras más frecuente en Occidente, representando el 30% de las leucemias del adulto. Presenta un curso clínico altamente variable con una sobrevida que oscila entre unos pocos meses y más de una década a partir del diagnóstico. Alrededor de un tercio de los pacientes tienen escasa sintomatología y una sobrevida similar a la de la población general, un tercio presenta una etapa indolente seguida de progresión y muerte por causas ligadas a la enfermedad, mientras que el tercio restante debuta con enfermedad agresiva y requiere tratamiento inmediato. Si bien los sistemas de estadificación poseen importancia pronóstica y terapéutica, no son suficientes para definir formas estables o progresivas de la enfermedad en estadios tempranos de la misma. Esta situación ha motivado un gran interés en definir parámetros que permitan predecir el curso de la enfermedad, existiendo al presente diferentes factores pronóstico. Entre ellos cabe destacar los estadios clínicos, los rearreglos genómicos y las mutaciones de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV). Este último ha permitido definir dos grupos con diferente curso clínico: pacientes con el gen mutado (M) asociados a pronóstico favorable, y aquellos con IGHV no mutado (NM), relacionados a progresión de la enfermedad.

En el presente trabajo, evaluamos el estado mutacional y los rearreglos IGHV-D-J en 102 pacientes argentinos con LLC. Los resultados fueron correlacionados con los rearreglos genómicos. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Para el análisis de los rearreglos genómicos se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica con estimulación mitogénica, empleándose técnica de bandeo G para el estudio citogenético y sondas específicas de LLC para el análisis de citomolecular. La evaluación del estado mutacional se efectuó a partir de ARN de pacientes, obtención del cDNA y secuenciación bidireccional. Las secuencias fueron analizadas usando las bases IgBLAST (immunoglobulin BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast) e ImMunoGeneTics (IMGT) (http://imgt.cines.fr). Los resultados fueron comparados con los reportados en otras regiones geográficas. Para el análisis estadístico se utilizaron el test de Mann–Whitney, el test t de Student y la prueba de χ^2 o el test Exacto de Fischer.

El 60,6% de los casos fueron M en tanto que el 39,4% restante resultaron NM. Dos pacientes presentaron doble rearreglo NM. La evaluación de las familias IGHV mostró el siguiente orden de frecuencias IGHV3>IGHV4>IGHV1, detectando un comportamiento diferente al de los países Occidentales, cuyas frecuencias son: IGHV3>IGHV1>IGHV4. Aunque el orden de frecuencias de nuestros pacientes es similar a China, los países asiáticos presentan más VH4 y menos VH1. Asimismo, el gen más frecuentemente usado fue IGHV1-69 (10,0%) seguido por IGHV3-23 e IGHV4-34 (9,4% cada uno), IGHV3-21 (6,7%), IGHV3-48 e IGHV4-59 (4,8% cada uno). El segmento IGHV1-69 fue el más común como ocurre en países Europeos pero mucho mayor que en los países Asiáticos; por su parte IGHV3-21 presentó una frecuencia mayor que la correspondiente a la región Mediterránea. Nuestra serie mostró receptores estereotipados en 13,5% (14/104) de los pacientes; 11,5% (12 casos) correspondieron a subsets mayores. El subset #2 fue el de mayor frecuencia (3,8%), seguido por subset #4 (2,9%), subsets #1 y #16 (1,9% cada uno) y subsets #3 y #8 (1%). Esto se diferencia de las series europeas cuyo orden de frecuencias es subset #2> subset #1> subset #4.

La correlación con el cariotipo mostró que los pacientes NM tenían mayor número de alteraciones así como un porcentaje más alto de translocaciones desbalanceadas (33%) respecto de los M (20%). En el grupo M, la proporción de casos con deleción 13q14 fue significativamente mayor que aquellos con trisomía 12 (12%) y con deleción de los cromosomas 17p y 11q (11.7%) (p= 0,003), sustentando el valor pronóstico de ambos parámetros.

Concluyendo, en el presente trabajo evaluamos el estado mutacional y de los rearreglos IGHV-D-J en pacientes argentinos con LLC. Nuestros resultados evidenciaron un uso de genes IGHV similar al reportado en poblaciones occidentales, aunque con interesantes diferencias que reflejan variaciones en el background genético y/o en los factores ambientales. La presencia de BCR estereotipados sustenta la hipótesis de la existencia de estímulos antigénicos específicos o epitopes estructuralmente similares en el desarrollo y la patogénesis de la LLC. Estos hallazgos contribuyen a una mejor caracterización biológica de la patología, pudiendo ser de importancia en un futuro en la definición de decisiones terapéuticas.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clinically heterogeneous disease. The mutational status of the *immunoglobulin heavy chain variable region* (IGHV) defines two disease subgroups: mutated (M) and unmutated (UM), with different clinical course. IGHV-D-J gene rearrangements and mutational status were analyzed in 102 Argentinian patients with CLL, by reverse transcriptase–polymerase chain reaction and bidirectional sequencing. Stereotyped B cell receptors (BCRs) were also evaluated. Results were compared with those reported in other geographic regions. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analysis were also performed. A total of 63 cases (60.6%) were M, and 41 (39.4%) were UM, two patients showed double IGHV rearrangements. The most frequently used IGHV families were IGHV3>IGHV4>IGHV1, with differences from frequencies observed in Western countries. The IGHV1-69 gene (10%) was the most commonly used, followed by IGHV3-23 and IGHV4-34 (9.4%, each), IGHV3-21 (6.7%), IGHV3-48 and IGHV4-59 (4.8%, each). IGHV1-69 frequency was similar to Western countries but higher than China frequency. Stereotyped VH HCDR3 (*heavy chain complementary determining region 3*) was found in 13.5% of patients; 11.5% belonged to major subsets. Subset #2 was the most frequently found, followed by subset #4, and subsets #1 and #16, with differences with respect to European series that showed subset #2> subset #1> subset #4. Deletion of chromosome 13q14 as a single alteration was more frequently observed in the M (48%) than in the UM group (21%). In the M group, the proportion of cases with deletion of chromosome 13q14 as the only aberration was significantly higher than those with trisomy 12 and those with deletions of chromosomes 17p and 11q (p>0.003). Our results showed that Argentinian patients with CLL display an IGHV gene usage that resembles to those observed in Western countries, but with interesting differences that reflect variations in the genetic background.

REFERENCIAS

1. Dighiero G, Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia. Lancet 2008; 371:1017-29.
2. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 15: 1840-7.
3. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94:1848-54.
4. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. Blood 2015; 125:856-9.
5. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2017; 31: 282-91.
6. Hallek M, Cheson B, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL**.** Blood 2018; 131: 2745–60.
7. Pristch o, Magnac C, Dumas G, et al .V gene usage by seven hybrids derived from CD5+ B-cell chronic lymphocytic leukemia and displaying autoantibody activity. Blood 1993; 82: 3103–12.
8. van Dongen JJ, Langerak A, Bru¨ggemann M, et al.Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17, 2257–317.
9. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. Blood 2007; 109:259-70.
10. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. Br J Haematol 2009; 144: 492-506.
11. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. Blood 2012; 119: 4467-75.
12. ISCN. *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature.* (2016) McGowan-Jordan, J., Simons, A. and Schmid, M. (eds). Karger, Basel.
13. Palmitelli M, Stanganelli C, Stella F, et al. Analysis of basal chromosome instability in patients with chronic lymphocytic leukaemia. Mutagenesis 2019; 34: 245-52.
14. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, et al. The complex nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. J Exp Med 1998; 188: 2151-62.
15. Mauerer K, Zahrieh D, Gorgun G, et al. Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. Br J Haematol 2005; 129: 499-510.

16. Marinelli M, Ilari C, Xia Y, et al. Immunoglobulin gene rearrangements in Chinese and Italian patients with chronic lymphocytic leukemia. Oncotarget 2016; 7(15): 20520-31.

17. Travella A, Ripollés L, Aventin A, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukemia. Cytogenetic and FISH analysis. Hematol Oncol 2013: 31: 339–47.

18. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. Blood. 2019; 13:1205-16.

19. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study of 506 cases analyzed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV_H status and immunophenotyping. Leukemia 2007; 21: 2442-51.

20. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2002; 100: 1410-6.

21. Bianchi S, Moreno P, Landoni AI, et al. Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymph 2010; 51: 2070-8.

22. Agathangelidis A, Vardi A, Baliakas P, Stamatopoulos K. Stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymph, 2014; 55:2252-61.

23. Maura F, Cutrona G, Fabris S, et al. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. PLoS One 2011; 6: e24313.

24. Rossi D, Spina V, Cerr M y col. Stereotyped B-cell receptor is an independant risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to richter syndrome. Clin Cancer Res 2009; 15: 4415-22.

25. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al. Subset with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicates a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. Blood 2004; 104: 2879-85.

26. Cahill N, Sutton LA, Jansson M, et al. IGHV3-21 gene frequency in a Swedish cohort of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. Clin Lymph, Myeloma Leuk 2012; 12: 201-6.

27. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. J Intern Med 2008; 264: 549-62.

28. Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, Chiorazzi N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. Blood 2004; 103: 3490-5.

VIRUS NEUROTRÓPICOS TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS (MOSQUITO BORNE VIRUS) EN LA PROVINCIA DE CHACO

Ornela Sofia Stechina[1,2], Griselda Inés Oria[1], Carla Noel Álvarez[1,2], Marina Stein[1,2]

[1]Instituto de Medicina Regional. [2]CONICET - CCT - Nordeste

INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por virus transmitidos por mosquitos representan algunas de las enfermedades virales emergentes y reemergentes del mundo (Gubler, 2002). En los últimos años, consecuencia de la expansión urbana acelerada, el trazado de la trama urbana se caracterizó por presentar un paisaje con heterogeneidad socioeconómica y demográfica (Hotez, 2017; World Health Organization, 2015; Nash et al, 2001; Soldan y Gonzalez-Scarano, 2005; Enserink, 2007). Estas condiciones, facilitan en gran medida, que los virus que tienen reservorios animales, como los arbovirus puedan saltar entre especies para infectar a los humanos (Gubler, 2002). Esto ha llevado a que numerosos arbovirus sean considerados como patógenos con alta prioridad, particularmente aquellos que infectan el sistema nervioso central (SNC) y causan encefalitis aguda (Patógenos prioritarios, http://www.niaid.gov/biodefense/PDF/cat.pdf). Estos arbovirus neurotrópicos se caracterizan por presentar alta morbilidad y mortalidad clínica, potencial de transmisión de aerosoles, falta de contramedidas efectivas para la prevención o control de enfermedades, entre otros (Sidwell et al, 2003; Bronce et al, 2002).

En Argentina, los virus neurotrópicos del género *Flavivirus* (*Flaviviridae*) que circulan o han circulado, tales como *Saint Louis Encephalitis Virus* (SLEV) y *West Nile Virus* (WNV), están asociados principalmente a mosquitos del género *Culex* spp. La primera epidemia de SLEV en la provincia de Córdoba en el año 2005 representa un cambio importante para la epidemiología de este virus en Sudamérica (Spinsanti et al., 2008). Durante la epidemia se aislaron, a partir de mosquitos *Culex quinquefasciatus*; dos cepas correspondientes al genotipo III (Diaz et al., 2006). Los estudios realizados por Diaz et al. (2009) permitieron aportar evidencia respecto a los ciclos de transmisión de SLEV en la zona central de Argentina, donde los mosquitos *Culex quinquefasciatus* y *Culex interfor* estarían implicados en el mantenimiento del virus en el ambiente urbano. WNV se reporta por primera vez en Argentina a comienzos del 2006 por un aislamiento del virus en equinos de la provincia de Buenos Aires (Morales et al., 2006). Estudios serológicos realizados años después, en cinco localidades del centro-norte de Argentina de las provincias de Chaco (Monte Alto), Córdoba (Mar Chiquita y Montecristo) y Tucumán (San Miguel de Tucumán), evidencian actividad del WNV (Díaz et al., 2008). Este virus comparte además similitudes antigénicas con el virus SLEV y los mosquitos vectores involucrados en sus ciclos de transmisión.

Los virus neurotrópicos del género *Alphavirus* (*Togaviridae*) con circulación en Argentina están agrupados en complejos antigénicos diferentes. *Pixuna virus* (PIXV) fue detectado por primera vez en el año 2010 en la provincia de Tucumán en mosquito de la

especie *Aedes aegypti*, y pertenece al complejo de la Encefalitis Equina Venezolana (complejo EEV). *Rio Negro virus* (RNV), pertenece al mismo complejo y fue detectado por primera vez en la provincia del Chaco en mosquitos de la especie *Culex delpontei* propuesto como vector (Mitchell et al. 1985). Estudios posteriores (Pisano et al. 2010) detectaron RNV en mosquitos del género *Culex maxi*, *Psorophora cingulata* y *Psorophora* spp. sugiriendo que otras especies, además de *Culex delpontei*, podrían estar implicadas en el ciclo de transmisión de RNV. *Madariaga virus* (MADV), pertenece al complejo antigénico de la Encefalitis Equina del Este (complejo EEE) y fue aislado originalmente hace más de 80 años del Partido General Madariaga, Provincia de Buenos Aires en Argentina (Sabattini et al., 1985). Antes de que se informara el primer brote de encephalitis por MADV en un niño de Darien en Panamá, el MADV estaba únicamente asociado a las epizootias en équidos (Brault et al., 1999, Young et al., 2008, Arrigo et al., 2010, Weaver et al., 2012). Durante este brote, MADV y VEEV co-circularon, con más de 100 casos sospechosos y 19 hospitalizaciones por encefalitis. MADV se confirmó en 13 casos, VEEV en 11, y se detectó un caso de infección dual. En América del Sur, MADV estuvo involucrado en numerosas epizootias, algunas de ellas con miles de casos, en Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela. Hasta la fecha, se han notificado casos humanos en Brasil (1956) y Trinidad (1970) (Scott y Weaver 1989, Sabattini et al., 1998, Novaes Oliveira et al., 2014). Varias especies de mosquitos han sido incriminadas como potenciales vectores de MADV (Armstrong y Andreadis 2010, Bingham et al., 2016, Molaei et al., 2015), sin embargo, aún no se conoce cuáles podrían ser los posibles mosquitos vectores en Argentina.

Debido a la importancia de estos virus para la salud humana y animal, el objetivo del presente estudio fue la detección e identificación de los virus neurotrópicos a partir de mosquitos colectados en las provincias de Chaco y su aislamiento en cultivo de células de la microglía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la detección del genoma viral de los arbovirus neurotrópicos se procesaron mosquitos adultos colectados con trampas de luz tipo CDC suplementadas con hielo seco ubicadas en diferentes sitios en las provincias de Chaco en diferentes estaciones desde el año 2012 hasta el año 2015.

Para el procesamiento de los mosquitos colectados, previamente se determinaron taxonómicamente bajo platina refrigerada utilizando las claves taxonómicas de Darsie (1985) y Consoli et al. (1994). Los pools agrupados por especie, sexo, sitio, fecha de colecta y estado alimentario se homogeneizaron en morteros estériles y diluidos en medio esencial mínimo (MEM) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB), 1% con antibiótico y 1% con antimicótico, luego fueron centrifugados 11.400 g durante 30 min en centrífuga refrigerada para su descontaminación. Previo a la detección del RNA viral por retrotrascripción seguida por PCR-Nested se realizó extracción del RNA viral con kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras positivas que pasaron el control de calidad fueron purificadas y secuenciadas (Ré et al., 2008). A partir de las secuencias consenso, editadas utilizando el programa MEGA X (Kumar et al., 2018), se realizó la identificación del agente detectado se llevó a cabo mediante estudios de homología de secuencias utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

A partir del encéfalo de 5 cobayos de raza Hartley (1-3 días de vida) se prepararon cultivos de células de la microglía para el aislamiento de los virus neurotrópicos detectados. El cultivo con células del encéfalo será almacenado en un incubador a 37ºC, con una concentración de CO2 del 5% y 21% de oxígeno. Trascurridos los 20 días, se llevará a cabo el aislamiento de la población microglial mediante tripsinización suave. Para ello se retirará el medio condicionado y se reserva para su posterior uso, se lavarán las células con medio simple y se añadirá tripsina-EDTA 0.25% diluida en proporción 1:3 en medio simple. Tras 15 minutos la monocapa de células no microgliales en suspensión se retirará, obteniendo así cultivos prácticamente puros de microglía (Cholich et al, 2021).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

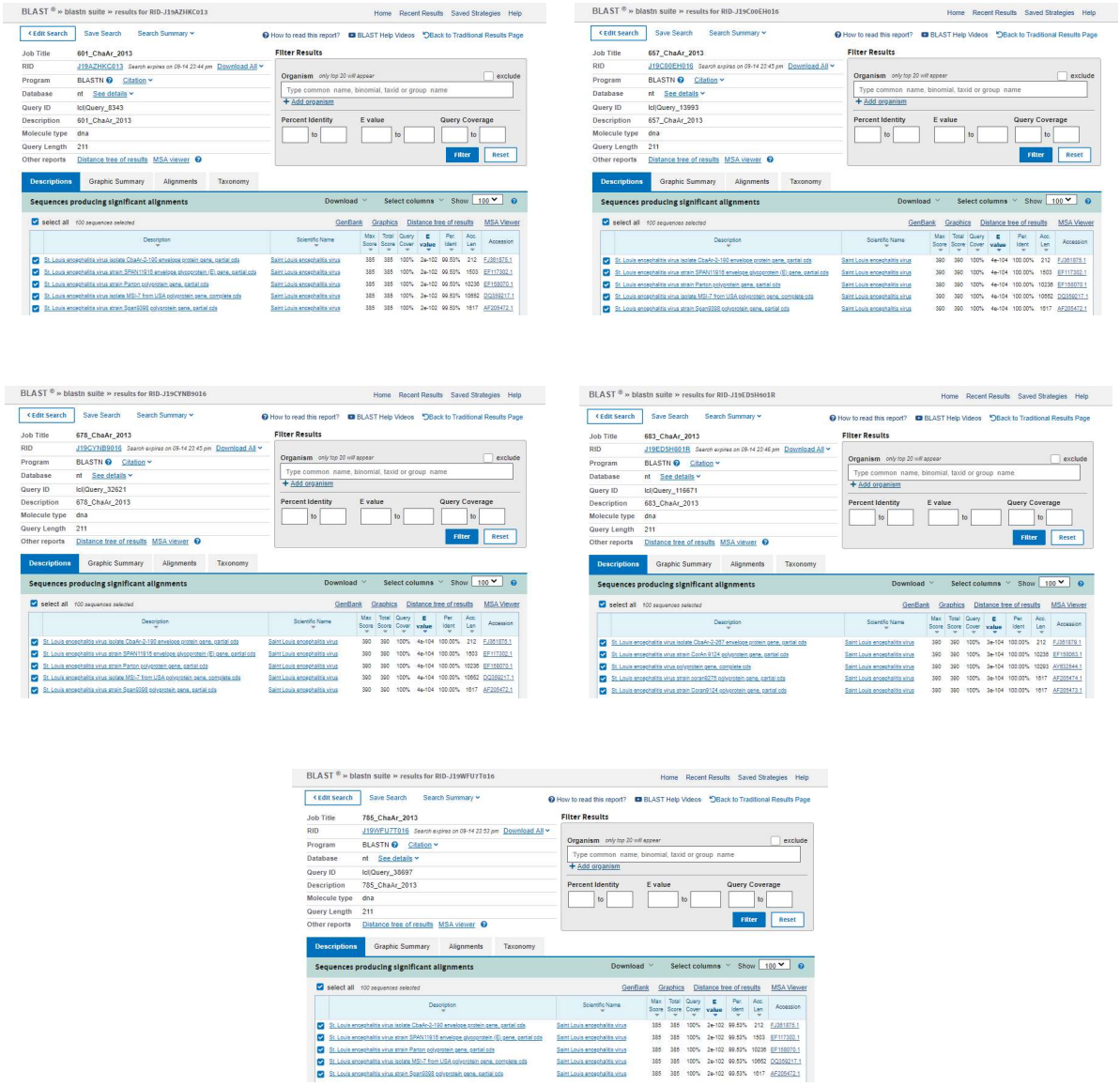
Para la detección del genoma viral se procesaron un total de 763 pools conteniendo un total de 11.516 mosquitos hembra, de las cuales el 4,2% estaban alimentadas. Los géneros procesados fueron *Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Psorophora* y *Wyeomyia*.

Géneros	Especies	Pools	Sitios*
Aedeomyia	1	12	CHpi/CHr
Aedes	6	85	CHpi/CHr
Anopheles	6	47	CHpi/CHr
Coquillettidia	1	4	CHpi/CHr
Culex	17	476	CHpi/CHr
Haemagogus	-	1	CHpi
Mansonia	2	59	CHpi/CHr
Psorophora	9	78	CHpi/CHr
Wyeomyia	1	1	CHr

*__CHpi__: Pampa del Indio provincia de Chaco, __CHr__: Resistencia provincia de Chaco.

De los pools procesados, 318 pools resultaron positivos (133 pools de Resistencia-CH, 185 pools de Pampa del Indio-CH). Un total de 314 pools fueron positivos para flavivirus y 4 para alphavirus.

De los pools secuenciados, se identificaron un total de 48 pools positivos de los cuales únicamente cinco de las secuencias obtenidas contra todas las secuencias disponibles en la base de datos del Genbank dieron como resultado valores de similitud mayores al 99% con secuencias identificadas como SLEV. El resto de los pools identificados por Blast (43/48) no son virus neurotrópicos. El aislamiento de los SLEV detectados en mosquitos continua en proceso, ya que debido al ASPO no se pudo realizar en el tiempo propuesto.



En relación a WNV, si bien en este trabajo no se detectó circulación en los sitios de estudio durante el período de muestreo, debido a la importancia de WNV actualmente se continúa con la vigilancia de los virus transmitidos por mosquitos en diferentes provincias y ciudades de Argentina. El resto de los pools positivos (276/324) que no fueron secuenciados por no cumplir con las condiciones mínimas serán sometidos a PCR específicas para cada virus.

Los mosquitos cumplen un rol fundamental en la replicación y trasmisión para la gran mayoría de los flavivirus y alphavirus. En este trabajo, las especies de mosquito positivas para SLEV fueron *Culex bidens*, *Aedes stigmaticus*, *Culex imitator* y un pool determinado como *Culex* (*Cux.*) spp. *Culex bidens*/*interfor* es el vector secundario de SLEV propuesto para el área templada y los ensayos de competencia vectorial confirman su susceptibilidad de la infección y transmisión del virus (Beranek et al., 2018).

Debido a que la detección de estos virus en mosquitos brinda una información relativamente precisa sobre el tiempo-espacio en los que circulan estos virus, se pudo identificar la circulación de SLEV durante la primavera y el otoño del año 2013 en la ciudad de Pampa del Indio. Estos datos coinciden con estudios realizados por Oria et al., (2018) de prevalencias de anticuerpos (Ac) contra SLEV en equinos en tres localidades de Chaco, en el que se presentaron las mayores prevalencias de Ac contra SLEV durante el otoño de 2013.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong PM, Andreadis TG. Eastern equine encephalitis virus in mosquitoes and their role as bridge vectors. Emerg Infect Dis. 2010; 16(12):1869-74. doi: 10.3201/eid1612.100640. PMID: 21122215; PMCID: PMC3294553.
- Arrigo, N. C., Adams, A. P. & Weaver, S. C. Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision † Downloaded from. J. Virol. 2010; 84:1014–1025.
- Beranek M, Quaglia AI, Peralta GC, Diaz LA, Stein M, Almirón WR, et al. Competencia vectorial del virus St. Louis encephalitis (Flavivirus: Flaviviridae) en dos poblaciones de Culex quinquefasciatus de Córdoba y Resistencia. La Rioja, Argentina: XI Jornadas Regionales sobre Mosquitos; 2018.
- Bingham DD, Costa S, Hinkley T, Shire KA, Clemes SA, Barber SE. Physical Activity During the Early Years: A Systematic Review of Correlates and Determinants. Am J Prev Med. 2016; 51(3):384-402. doi: 10.1016/j.amepre.2016.04.022. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27378255.
- Brault AC, Shope RE, Lopez RN, Weaver SC, Tesh RB, Kang W, Chavez CL, Gutierrez LF, Cachón MF, Powers AM. Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central, and South America. Am J Trop Med Hyg. 1999; 61(4):579-586. doi:10.4269/ajtmh.1999.61.579.
- Bronce MS, Huycke MM, Machado LJ, Voskuhl GW, Greenfield RA. Agentes virales como armas biológicas y agentes de bioterrorismo. Soy. J.Med. ciencia 2002; 323 (6):316–325.
- Cholich, Luciana-Andrea, Pistán, María-Elena, Torres, Ana-María, Ortega, Hugo-Héctor, Gardner, Dale-R., & Bustillo, Soledad. Characterization and cytotoxic activity on glial cells of alkaloid-enriched extracts from pods of the plants Prosopis flexuosa and Prosopis nigra (Fabaceae). Revista de Biología Tropical. 2021; 69(1):197-206. https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v69i1.43515.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. Principias Mosquitos de Importancia Sanitâria no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.
- Darsie RF. Mosquitos of Argentina.Part I.Keys for identification of adult females and fourth stages larvar in english and spanish (Diptera: Culicidae). Mosq Syst 1985; 17:153–253.
- Diaz LA, Occelli M, Almeida FL, Almirón WR, Contigiani MS. Eared Dove (Zenaida Auriculata, Columbidae) as Host for St. Louis Encephalitis Virus (Flaviviridae, Flavivirus). Vector-Borne Zoonotic Dis 2008; 8:277–82. doi:10.1089/vbz.2007.0168.

- Diaz LA. Patrones de actividad del VSLE en Córdoba. Universidad Nacional de Cordoba, 2009.
- Diaz, L., Re, V., Almiron, W., Farias, A., Vazquez, A., Paz Sanchez-Seco, M., Aguilar, J., Spinsanti, L., Konigheim, B., Visintin, A., Garcia, J., Morales, M., Tenorio, A., & Contigiani, M. Genotype III Saint Louis Encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. Emerging Infectious Diseases. 2006; 12(11):1752-1754. http://dx.doi.org/10.3201/eid1211.060486. PMid:17283629.
- Enserink M. Enfermedades infecciosas. Chikungunya: ya no es una enfermedad del tercer mundo. Ciencias. 2007; 318(5858):1860–1861.
- Gubler DJ. El surgimiento/resurgimiento global de las enfermedades arbovirales como problemas de salud pública. Arco Med Res. 2002; 33(4):330–342.
- Hotez PJ. Global urbanization and the neglected tropical diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005308. doi:10.1371/journal.pntd.0005308.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 2018; 35:1547–9.
- Laurito M, Ayala AM, Almirón WR, Gardenal CN. Molecular identification of two Culex (Culex) species of the neotropical region (Diptera: Culicidae). PLoS One 2017; 12:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0173052.
- Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini MS, Daffner JF, Cropp CB, Calisher CH, et al. Arbovirus isolations from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of western equine encephalitis in Argentina. Am J Trop Med Hyg 1987; 36:107–13. doi:10.4269/ajtmh.1987.36.107.
- Monath TP, Sabattini MS, Mitchell CJ, Bowen GS, Service PH, Services H, et al. Arbovirus Investigations in Argentina, 1977-1980 Surveys. 1985; 34:966–75.
- Molaei G, Huang S, Andreadis TG. Vector-Host Interactions of Culex pipiens Complex in Northeastern and Southwestern USA. J Am Mosq Control Assoc. 2012; 28(4s):127-136. doi:10.2987/8756-971X-28.4s.127.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. Emerg Infect Dis 2006; 12:1559–61. doi:10.3201/eid1210.060852.
- Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M. El brote de infección por el virus del Nilo Occidental en el Nuevo área de la ciudad de York en 1999. N Engl J Med. 2001; 344(24): 1807–1814.
- Novaes Oliveira, R., Iamamoto, K., Silva, M.L.C.R. et al. Eastern equine encephalitis cases among horses in Brazil between 2005 and 2009. Arch Virol. 2014; 159:2615–2620. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2121-4
- Oria GI, Spinsanti LI, Pirota VL, Martinez F, Stechina OS, Etchepare E, et al. Seroprevalence of Flavivirus in horses in Chaco, Argentina. Circulation during 2013-2014. Brazilian J Vet Med 2018; 40:1–10. doi:10.29374/2527-2179.bjvm045118.
- Patógenos prioritarios NIH/NIAID Categoría A, B y C. 2003 Disponible en http://www.niaid.gov/biodefense/PDF/cat.pdf.

- Pisano, M. B. et al. Venezuelan Equine Encephalitis Viruses (VEEV) in Argentina: Serological Evidence of Human Infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7:1–7
- Ré V, Spinsanti L, Farías A, Díaz A, Vázquez A, Aguilar J, et al. Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-nested PCR. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26:10–5. doi:10.1157/13114389.
- Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: Togaviridae, Alphavirus. In: Travassos da Rosa A, da Costa Vasconcelos PF, Travassos da Rosa J, editors. Overv. arbovirology Brazil Neighb. Ctries., Belém: Instituto Evandro Chagas. 1998; 135–52.
- Sabattini MS, Monath TP, Bowen GS, Control D, Service PH, Services H, et al. Arbovirus investigations in Argentina ,aspects and description of study sites. Am J Trop Med Hyg. 1985; 34:937–44.
- Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. J Virol Methods. 2005; 126:101–9. doi:10.1016/j.jviromet.2005.01.025.
- Scott TW, Weaver SC. Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission. Adv Virus Res. 1989; 37:277-328. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2574935. Accessed April 26, 2019.
- Sidwell RW, Smee DF. Virus de las familias Bunya- y Togaviridae: potencial como agentes de bioterrorismo y medios de control. Res. antivirales. 2003; 57(1–2):101–111
- Soldan SS, Gonzalez-Scarano F. Enfermedades infecciosas emergentes: los Bunyaviridae. J Neurovirol. 2005; 11(5):412–423.
- Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. J Clin Virol 2008; 42:27–33. doi:10.1016/j.jcv.2007.11.022.
- Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. Antiviral Research 2012; 94:242-257. doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002.
- World Health Organization. WHO | Urban population growth. WHO 2015.
- Young DS, Kramer LD, Maffei JG, Dusek RJ, Backenson PB, Mores CN, Bernard KA, Ebel GD. Molecular epidemiology of eastern equine encephalitis virus, New York. Emerg Infect Dis. 2008; 14(3):454-60. doi: 10.3201/eid1403.070816. PMID: 18325261; PMCID: PMC2570827.

ABSTRACT

Numerous emerging and re-emerging arboviruses around the world infect the central nervous system (CNS) and cause acute encephalitis. In Argentina, neurotropic viruses of the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae*), such as *Saint Louis Encephalitis Virus* (SLEV) and *West Nile Virus* (WNV), are mainly associated with mosquitoes of the genus *Culex*. The neurotropic viruses of the genus *Alphavirus* (*Togaviridae*) circulating in Argentina are grouped into different antigenic complexes. *Pixuna virus* (PIXV) and *Rio Negro virus* (RNV) belong to the Venezuelan Equine Encephalitis complex (VEE complex) detected in *Aedes aegypti* and *Culex delpontei*, among others. *Madariaga virus* (MADV), belongs to the Eastern Equine Encephalitis antigenic complex (EEE complex) and was isolated for the first time in the Partido General Madariaga, Province of Buenos. Several species of mosquitoes have been incriminated as potential vectors MADV. The objective of the present study was the detection and identification of neurotropic viruses from mosquitoes collected in the provinces of Chaco and their isolation. For the detection of the viral genome, a total of 763 pools of the genera Aedeomyia, Aedes, Anopheles, Coquillettidia, Culex, Haemagogus, Mansonia, Psorophora and Wyeomyia were processed, resulting in 318 positive pools. A total of 48 positive pools were sequenced and identified, of which only five of the sequences obtained were identified as SLEV and could not be isolated. The rest of the pools identified by Blast (43/48) are not neurotropic viruses. In this work, the mosquito species positive for SLEV were *Culex bidens*, *Aedes stigmaticus*, *Culex imitator* and *Culex* (*Cux*.) spp. SLEV circulation could be identified during the spring and autumn of 2013 in the city of Pampa del Indio.

EPIDEMIOLOGÍA DE MICROORGANISMOS RICKETTSIALES (RICKETTSIA, EHRLICHIA Y ANAPLASMA) ASOCIADOS A GARRAPATAS (ACARI: IXODIDAE) DE IMPORTANCIA SANITARIA EN ARGENTINA

Evelina L. Tarragona[a], Gabriel L. Cicuttin[b], Fernando S. Flores[c], Santiago Nava[a]

[a]Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICAL, INTA - CONICET). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA. [b]Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Ministerio de Salud del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. [c]Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT – CONICET)

INFORME FINAL

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG) engloban una triada: un artrópodo vector (garrapata), un hospedador vertebrado susceptible (que pueden ser animales o humanos) y un patógeno [microorganismo (MO) capaz de producir enfermedad). El hospedador primario es esencial para mantener la transmisión del patógeno, mientras que los hospedadores secundarios y accidentales, si bien no son esenciales, contribuyen con la amplificación del patógeno. Este último, es el caso del humano en una enfermedad zoonótica transmitidas por garrapatas (EZTG), que no es factor indispensable para el desarrollo del ciclo de la enfermedad, sino más bien se infectan al ser picados por un vector que se alimentó previamente de un hospedador animal. Para que una especie de garrapata sea considerada vector debe poseer competencia vectorial., es decir, la susceptibilidad intrínseca de una especie artrópoda a infectarse, replicar y transmitir un patógeno. Los parámetros ecológicos que afectan el ciclo de las ETG son: competencia vectorial, actividad estacional del vector, rango de distribución del vector, especificidad por hospedador y requisito de hábitat (Reisen, 2002). El estatus de una ETG puede variar dependiendo de la interacción entre estos cinco factores. Determinar la cantidad de vectores de vida libre naturalmente infectados con un patógeno determinado es el primer paso para identificar un potencial vector. La infección con bacterias del género *Rickettsia* es frecuente en garrapatas, sobre todo en el género *Amblyomma*, que causan una variedad de enfermedades en los seres humanos (Parola et al. 2013). La Rickkettsias se dividen en cinco grupos, siendo el grupo fiebre manchada (SFG) donde se nuclean las especies reconocidas por producir EZTG (Gillespie et al. 2007; Weinert et al. 2009). Actualmente se conoce que, el género *Ehrlichia* agrupa seis especies reconocidas, todas asociadas a especies de garrapatas como vectores. En estos últimos años en Sudamérica se han reportado cepas de *Ehrlichia* sp. que todavía no han sido caracterizadas a nivel especies.

La especie más emblemática es *Ehrlichia chaffensis* agente causas de la Ehrlichiosis Monocitica Humanna (EMH). En Argentina, Cicuttin et al. (2017; 2020) han reportado *Amblyomma tigrinum* y *Amblyomma triste*, dos especies que parasitan frecuentemente a humanos, naturalmente infectadas con *Ehrlichia* sp. cercanas filogenéticamente a *E. chaffeensis*. El género *Anaplasma* incluye ocho especies, de las cuales una es patógena para el hombre, *Anaplasma phagocytophilum*, y el resto afectan a animales doméstico (Rar et al., 2021). Actualmente en Argentina, se desconoce cuáles podrían ser las especies de garrapatas nativas involucradas como potenciales vectores de estas bacterias.

El objetivo del presente proyecto fue investigar aspectos relacionados a la diversidad, distribución y diagnóstico de microorganismos rickettsiales de los géneros *Rickettsia, Ehrlichia y Anaplasma*) potencialmente transmitidos por garrapatas de importancia sanitaria en Argentina.

Los objetivos específicos del presente proyecto fueron:

1. Determinar la presencia de bacterias de los géneros *Anaplasma, Ehrlichia* y *Rickettsia*, en garrapatas de los géneros *Amblyomma, Rhipicephalus, Haemaphysalis* e *Ixodes* de importancia médica y veterinaria, a través de técnicas de amplificación genómica.

2. Caracterizar genéticamente las bacterias detectadas y determinar la prevalencia de infección en cada especie de garrapata, como así también la especificidad de la asociación microorganismo-vector.

3. Inferir la distribución geográfica de las bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* detectadas en los objetivos anteriores y determinar la variación genética que existe entre diferentes cepas geográficas.

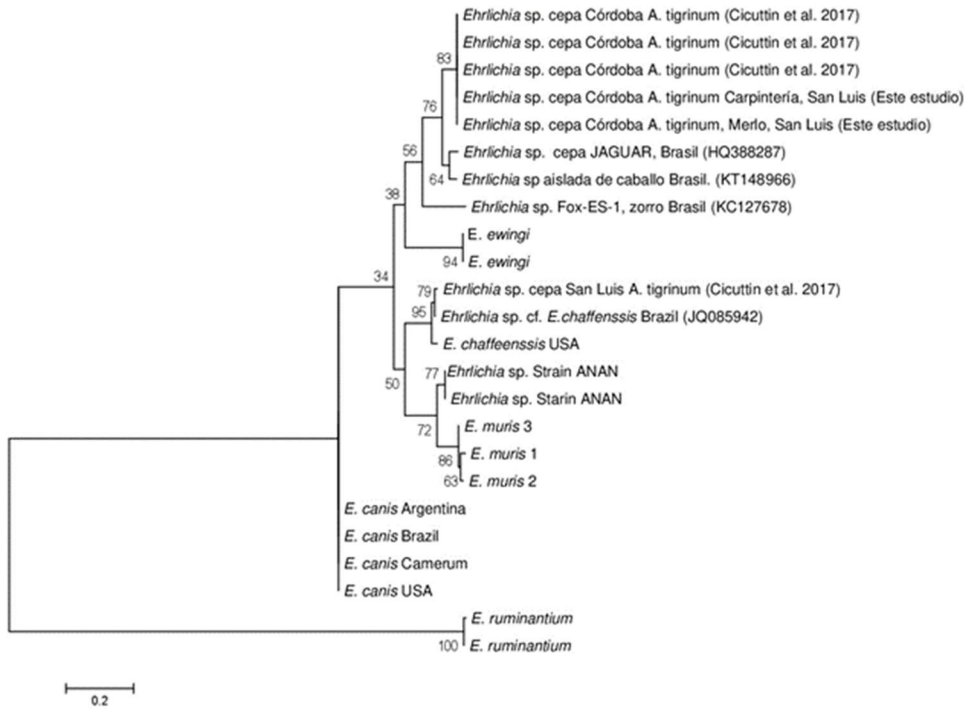
4. Modelar la distribución geográfica más probable para cada relación garrapata-microorganismo, a fin de determinar las áreas de riesgo epidemiológico y diseñar de estrategias de control

Durante el presente proyecto se procesaron un total de 1455 garrapatas duras colectadas en fase de vida libre (sobre vegetación por método de ¨dragging¨ o arrastre de bandera de tela) y fase parasitaria (sobre hospedadores domésticos y silvestres) de nueve localidades de las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, San Luis y Santiago del Estero (ver detalle en Tabla 1). Además, se obtuvieron muestras de sangre de hospedadores silvestres y domésticos. Los espéciemeles de garrapatas fueron identificadas a nivel de especies siguiendo a Nava et al. (2017). Garrapatas y las muestras de sangre conservadas con anticoagulante, fueron sometidas a extracción de ADN (ver metodología en Tarragona et al. 2022). Los ADNs obtenidos fueron procesados por reacción de polimeraza en cadena en tiempo real y tradicional (PCRr-t y PCR) a fin de amplificar edita-da utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) ADN de bacterias del orden Rickettsiales. Los productos amplificados de las muestras positivas fueron enviadas a secuenciar a la Unidad de genómica de INTA Castelar. Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) y comparadas con secuencias depositadas en la plataforma GenBank. Se realizaron análisis

filogenéticos con métodos de máxima verosimilitud (ML) usando el programa MEGA X (Kumar et al., 2018). Se determinaron los modelos de sustitución de mejor ajuste con el criterio de información de Akaike usando la prueba del modelo ML implementada en MEGA X. El soporte para las topologías fue probado por un ¨bootstrapping¨ de más de 1000 repeticiones.

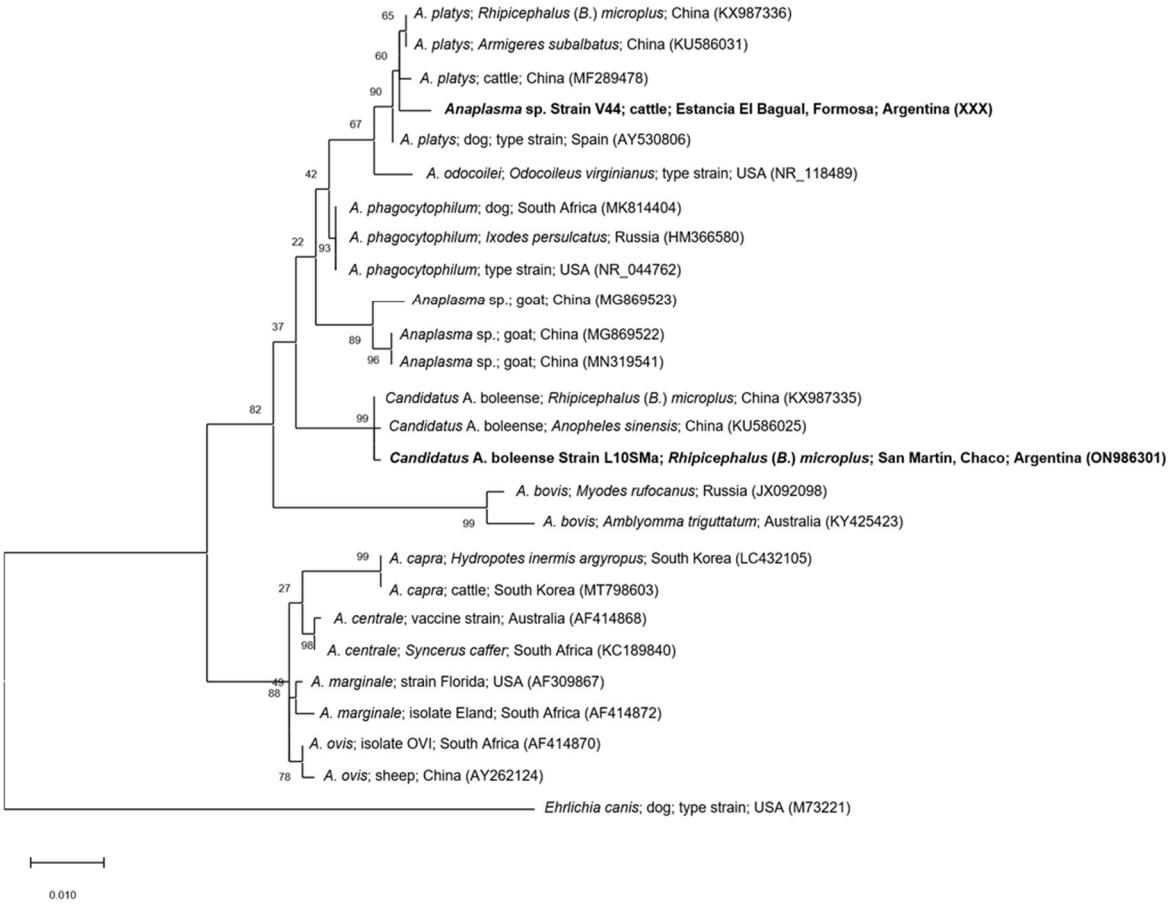
El protocolo de estudio fue aprobado por la Comisión de Ética Animal del CICUAE-CERSAN del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (protocolo n° P19–0012).
Del total de muestras analizadas se amplificó *Ehrlichia* sp. cepa Córdoba de dos garrapatas *Amblyomma tigrinum* de vegetación y parasitando a un perro en la provincia de San Luis. Esta Ehrlichia sp. cepa Cordobesa ya ha sido descripta por Cicuttin et al. (2017) en *A. tigrinum* de la localidad de Salsipuedes, Cordoba (100%) (Nº Genbank KY413807) (Ver figura 1). Los hospedadores principales de los adultos de *A. tigrinum* son carnívoros silvestres (Canidae y perros), mientras que pequeños roedores (Caviidae y Cricetidae) y aves son los hospedadores principales de los estadios inmaduros. Esta garrapata se ha reportado parasitando a humanos. La transmisión vertical de bacterias del género *Ehrilchia* parece ser exclusivamente por vía transestadial, dado que la transmisión transovárica no se ha demostrado hasta el momento. La infección con *Ehrlichia* se adquiere durante la alimentación de larvas o ninfas, la que se transmite a adultos de forma transestadial. Por lo tanto, pequeños roedores cricétidos o cavídicos podrían actuar como reservorios responsables del mantenimiento del ciclo enzoótico de Ehrlichia cepa Cordoba detectada en este trabajo que a priori sería una potencial nueva especie de patogenicidad desconocida para humanos. Estos resultados están en proceso de escritura de manuscrito para ser publicados en revista científica).

Figura 1.



Árbol filogenético contruído apartir de secuencias del gen dsb de Ehrlichia spp

De una ninfa de *Amblyomma ovale* parasitando a *Didelphis albiventris* (comadreja overa) se amplificó *Ehrlichia* sp. cepa ¨El bagual¨ cercana a una cepa de Ehrlichia reportada en osos perezosos de Brasil. De sangre de una *D. albiventris* se amplificó *Ehrlichia* sp. cepa Natal, esta cepa ya ha sido reportada en esta misma especie y en otras especies de comadrejas en Brasil. La patogenicidad para humanos de estas dos nuevas *Ehrlichias* es desconocida, futuros estudios para evaluarlo son necesarios dado que *A. ovale* parasita frecuentemente a humanos (Guglielmone y Robbins et al. 2018). Eatos resultados han sido publicados en Tarragona et al. (2022) (https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102043, material adjunto). Además, la sangre de uno de los bovinos muestreados en la estancia El Bagual se amplificó ADN de *Anaplasma* sp. like *platys* (Figura 2). Esta *Anaplasma* es cercana a *Anaplasma* sp. like *platys* reportado en bovinos y la garrapata común del bovino (*R. microplus*) en China, a priori se reconocen entidades diferentes. Resta amplificar otros genes que expresan mayor divergencia genética y comprarlos con secuencias amplificadas en bovinos de Bolivia (Ogata et al., 2021). Se desconoce cuál sería su potencial vector y su patogenicidad para los bovinos. Estos resultados están en proceso de escritura para ser publicados.



Se amplifico además Rickettsia belli en Amblyomma dubitatum parasitando a un tapir. Esta rickettsia pertenece al grupo de las rickettsias no patógenas dicha asociación ya ha sido reportada previamente. Además, se amplifico *Rickettsia* sp. cercana a *R. buchneri* de *Ixodes* sp. cf. *affinis* estos resultados han sido publicados en Sebastian et al. (2020) (https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105588, se adjunta).

Y finalmente, Un caso presuntivo de Ehrlichiosis canina en Rafaela, Santa Fe fue confirmado por amplificación del *Ehrlichia canis* a partir de muestra de sangre de caso clínico de perro. Este es el primer reporte para la zona y se confirma la potencial transmisión por R. *sanguineus* linaje templado. Estos resultados han sido publicados en Tarragona et al. (2019) (https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8438, se adjunta). Adicional mente reportó el hallazgo de una ninfa de *Amblyomma marmoreum* importada desde Sudáfrica a Argentina parasitando a una turista de retorno al país, al ser de importancia sanitaria se realizó, después de ser identificada, amplificación de genoma de los microorganismos estudiados en el presente proyecto. No se amplifico ADN del orden Anaplasmataceae y la paciente no presento síntomas sistémicos, solo signos de inflación en la zona de fijación de la garrapata. Resultados publicados en Tarragona et al. (2021) (https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100544, se adjunta).

Para dar respuesta al cuarto objetivo especifico se está sumando material de otros proyectos con toda la información se modelará las distribuciones geográficas para cada asociación Microorganismo- especie de garrapata.

Tabla 1. Cantidad (N) de especies de garrapatas colectadas de vegetación y hospedadores domésticos y silvestres por localidad y provincia. *gltA*= gen amplicado para detección de bacterias del género Rickettsias y 16S= gen amplificado para bacterias de la familia Anaplasmataceae (géneros *Ehrlichia y Anaplasma*). 0=negativo, 1=positivo.

Provincia	***Lugar***	***Especie***	***Hospedador***	***N***	***gltA***	***16S***	***Resultados***
Chaco	*PN Chaco*	*H. juxtakochi*	*Vegetación*	*22*	*0*	*0*	
		A. sculptum	*Vegetación*	*42*	*0*	*0*	
Corrientes	*Estero de Iberá*	*Amblyomma sp.*	*Myrmecophaga tridactyla*	*1*	*0*	*0*	
		A. dubidatum	*Blastocerus dichotomus*	*2*	*0*	*0*	
		A. dubidatum	*Myrmecophaga tridactyla*	*26*	*0*	*0*	
		A. dubidatum	*Tapirus terrestris*	*31*	*1*	*0*	*Rickettsia bellii*
		A. dubidatum	*Ozotoceros bezoarticus*	*11*	*0*	*0*	
		A. sculptum	*Myrmecophaga tridactyla*	*24*	*0*	*0*	
		A. trsite	*Ozotoceros bezoarticus*	*1*	*0*	*0*	
		A. trsite	*Tapirus terrestris*	*4*	*0*	*0*	
		H. juxtakochi	*Tapirus terrestris*	*4*	*0*	*0*	
		R. microplus	*bovino*	*5*	*0*	*0*	
		R. microplus	*Blastocerus dichotomus*	*4*	*0*	*0*	
		R. microplus	*Tapirus terrestris*	*5*	*0*	*0*	
		R. microplus	*Ozotoceros bezoarticus*	*5*	*0*	*0*	
	PN Mburucuyá	*A. dubidatum*	*vegetación*	*9*	*0*	*0*	

		A. calcaratum/A.nodosum	*Aves*	*5*	*0*	*0*	
		A. ovale	*Vegetación*	*52*	*0*	*0*	
		H. juxtakochi	*aves*	*74*	*0*	*0*	
		H. juxtakochi	*vegetación*	*78*	*2*	*1*	*Rickettsia sp.,; Ehrlichia sp.*
		I. sp. cf affinis	*vegetación*	*11*	*1*	*0*	*Rickettsia sp. cf. R. buchneri*
Formosa	*El Bagual*	*A. nodosum*	*vegetación*	*1*	*0*	*0*	
		A. ovale	*Vegetación*	*25*	*0*	*0*	
		A. ovale	*Didelphis albiventris*	*52*	*0*	*1*	*Ehrlichia sp. cepa ¨El Bagual¨*
		A. sculptum	*Vegetación*	*153*	*0*	*0*	
		A. sculptum	*bovinos*	*16*	*0*	*0*	
		A. triste	*Vegetación*	*41*	*0*	*1*	*Ehrlichia/Anaplasma*
		A. triste	*Bovinos*	*12*	*0*	*0*	
		H. juxtakochi	*Vegetación*	*49*	*0*	*0*	
		H. juxtakochi	*bovinos*	*6*	*0*	*0*	
		Ixodes sp. cf affinis	*vegetación*	*9*	*0*	*0*	
		R. microplus	*bovinos*	*367*	*SD*	*SD*	
		A. nodosum	*Vegetación*	*1*	*1*	*1*	
	PN Pilcomayo	*A. sculptum*	*Vegetación*	*42*	*0*	*0*	

	Reserva	*A. sculptum*	*Vegetación*	*116*	*0*	*0*	
	PrivadaEco-portal	*I. parariciinus*	*Vegetación*	*26*	*0*	*0*	
Jujuy	*de piedra*	*H. juxtakochi*	*Vegetación*	*50*	*0*	*0*	
	Merlo	*A. tigrinum*	*Perro*	*47*	*0*		*1 Ehrlichia sp. cepa Córdoba*
San Luis	*Carpinteria*	*A. tigrinum*	*Vegetación*	*22*	*0*	*1*	*1 Ehrlichia sp. cepa Córdoba*
Santiago del Estero	*Quimili*	*A. tigrinum*	*perros*	*34*	*34*	*34*	

Tabla 2. Hospedadores domésticos y silvestres muestreados muestreados en dos provincias a fin de amplificar, a partir de muestras de sangre, ADN de bacterias de la familia Anaplasmataceae.

							Muestra Sangre PCR*		*Resultados*
Provincia	Localidad	Hospedador	Fecha	ID	Edad	Sexo	16S rRNA	*dsb*	
Formosa	Reserva privada ¨El Bagual¨	*Didelphis albiventris*	2018-04-07	01/1º	J	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2018-04-07	02/1º	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2018-04-07	03/1º	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2018-04-08	04/1º	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2018-04-08	05/1º	J	M	1	1	*Ehrlichia* sp. cepa Natal
		Didelphis albiventris	2018-06-29	02	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2018-08-31	03	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-05	05	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-05	06	J	M	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-05	07	J	M	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-05	08	J	M	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-05	09	J	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-06	10	A	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-07	11	J	F	0	0	
		Didelphis albiventris	2019-12-07	12	J	M	0	0	
		20 bovinos	2019-5-12		A	H	1	0	*1 Ehrlichia* sp. like *platys*
Santa Fe	Rafaela	Perro	2019-2-29		A	M	1	1	*Ehrlichia canis*

REFERENCIAS

- Cicuttin, G.L., De Salvo, M.N., Nava, S., 2017. Two novel Ehrlichia strains detected in Amblyomma tigrinum ticks associated to dogs in peri-urban areas of Argentina. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 53, 40–44.
- Cicuttin, G.L., De Salvo, M.N., P´erez, P.D., Silva, D., F´elix, M.L., Venzal, J.M., Nava, S., 2020. A novel Ehrlichia strain (Rickettsiales: anaplasmataceae) detected in Amblyomma triste (Acari: ixodidae), a tick species of public health importance in the Southern Cone of America. Pathog. Glob. Health. 114 (6), 318–322.
- Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, PurkayasthaA., Sobral BS, Azad AF, 2007. Plasmids and rickettsial evolution: insight fromRickettsia felis. PLoS ONE 2, 266.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. 41, 95–98.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35, 1547–1549.
- Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Ed. Elsevier, Academic Press, London. p. 352.
- Ogata, S., Pereira, J. A. C., Jhonny, L. V. A., Carolina, H. P. G., Matsuno, K., Orba, Y., ... & Nakao, R. 2021. Molecular Survey of Babesia and Anaplasma Infection in Cattle in Bolivia. Veterinary sciences, 8(9), 188.
- Parola P, Paddock CD, Scolovschi C, Labruna MB, Mediannokov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clinical Microbiology Reviews. 26:657–702.
- Rar, V., Tkachev, S., Tikunova, N. 2021. Genetic diversity of Anaplasma bacteria: twenty years later. Infection, Genetics and Evolution, 91, 104833.
- Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. 2009. Evolution anddiversity of Rickettsia bacteria. BMC Evolutionary Biology. 7: 6.

ABSTRACT

Tick-borne diseases encompass a triad: vector (tick), susceptible host, and pathogenic microorganism, all influenced by abiotic components. Therefore, determining the number of vectors naturally infected with a pathogen is only a first step in identifying a potential vector. The aim of this work was to investigate aspects related to the diversity, distribution and diagnosis of rickettsial microorganisms of the genera *Rickettsia, Ehrlichia* and *Anaplasma*) potentially transmitted by ticks of sanitary importance in Argentina. A total of 1455 vegetation ticks and ticks parasitizing wild and domestic animals, and 36 blood samples collected from nine locations in the provinces of Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, San Luis and Santiago del Estero were analyzed. The ticks were identified morphologically at the species level and were subjected, together with the blood samples, to DNA extraction. The DNAs obtained were subjected, using real time PCR and

traditional PCR techniques, to amplification of partial portions of the genome of bacteria of the *Ehrlichia, Anaplasma* and *Rickettsia* genera. Through phylogenetic analysis, the following associations are reported: *Ehrlichia* sp. Cordoba strain- *Amblyomma tigrinum*, *Ehrlichia* sp. Strain ¨El Bagual¨-*Amblyomma ovale*, *Ehrlichia* sp. Natal strain- *Didelphis albiventris*, *Anaplasma* sp. like *A. platys*- Cattle, *Rickettsia* sp. like *R. buchneri-Ixodes* sp. cf. affinis and *Rickettsia belli-Amblyomma dubitatum*. The findings of the current study represent the first report of these *Ehrlichia* strain associations for Argentina, showing that the diversity of *Ehrlichia* spp. is larger than previously assumed. Further studies should determine the epidemiological relevance of these findings.

In addition, during this project, the first confirmed case of monocytic canine ehrlichiosis (MCE) due to *Ehrlichia canis* was reported in the province of Santa Fe, Argentina, from endemic area of *R. sanguineus* temperate lineage. Additionally, the first record of *Amblyomma marmoreum* in Argentina imported into the country parasitizing a tourist returning from South Africa is reported. The results obtained were published in four high-impact scientific journals and two pending publication.

BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN NIÑOS CON ENFERMEDAD CELÍACA. IMPACTO DE LA DIETA LIBRE DE GLUTEN

Walter Francisco Tetzlaff, Adriana Bottero, Eliana Elizabeth Botta, Laura Boero

Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiología y Bioquímica Clínica, INFIBIOC - UBA

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es un proceso autoinmune que consiste en una intolerancia permanente a las proteínas del gluten. Se presenta en individuos genéticamente predispuestos y cursa con una enteropatía grave de la mucosa del intestino delgado superior, lo que favorece una malabsorción de los nutrientes. Su espectro clínico comprende dos formas: la clásica o típica, que se presenta con síndrome de malabsorción, y la no clásica o atípica, en la que se observan diversas manifestaciones extraintestinales como talla baja, anemia, epilepsias, ataxias, calcificaciones occipitales, aftas recurrentes, dermatitis herpetiformes, osteoporosis, etc. Además, ciertas condiciones fisiopatológicas que no están estrechamente vinculadas a la ingestión de gluten, como el síndrome de Down, de Williams, de Turner, la diabetes tipo 1, la tiroiditis de Hashimoto y la hepatitis autoinmune, se han visto asociadas a la EC (1,2). El único tratamiento de esta enfermedad es la adherencia a una estricta dieta sin gluten, la cual debe mantenerse a lo largo de toda la vida y que conduce a la desaparición de los síntomas clínicos, así como a la normalización de la mucosa intestinal (3).

Es la enfermedad crónica intestinal más frecuente, siendo su prevalencia entre 1% y 2% en la población general (4,5). En un estudio en población pediátrica de la República Argentina, se reportó una prevalencia del 1,2% (4). La incidencia y prevalencia de la EC se han quintuplicado en los últimos 25 años, lo cual no sólo es atribuible a una mayor conciencia y mejores pruebas de diagnóstico, sino también a una propagación real de la enfermedad (6,7). Debido a la importancia que reviste la detección temprana de la EC, el Ministerio de Salud de la Nación creó el Programa Nacional de Detección y Control de EC (5).

A pesar de los múltiples estudios realizados, aún existe escasa evidencia sobre la relación entre la EC y la enfermedad cardiovascular (ECV). En un importante estudio llevado a cabo en Suecia en aproximadamente 14.000 pacientes hospitalizados con EC, se observó mayor riesgo de infarto agudo de miocardio, de angina de pecho, de insuficiencia cardíaca, de hemorragia cerebral y de accidente cerebrovascular isquémico que en controles pareados por sexo y edad (8). No obstante, distintos estudios han reportado ausencia de factores de riesgo clásicos de ECV en pacientes con EC (9,10). Sin embargo, en un estudio previo de nuestro grupo (11), en pacientes adultos con EC se observó disminución del colesterol (C) de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y aumento de

la proteína C reactiva ultrasensible (PCRus), parámetro considerado marcador de inflamación asociado a elevado riesgo de ECV (12).

Por lo tanto, la inflamación podría constituir un nexo entre la EC y la ECV. De hecho, en población pediátrica con EC confirmada por biopsia se ha reportado un mayor número de células T CD4+ secretoras de interleuquina (IL) 21 en la lámina de la mucosa intestinal, hallándose la IL-21 involucrada en el proceso inflamatorio (13). Dado que la IL-21 es una citoquina pleiotrópica involucrada en el proceso inflamatorio, se ha sugerido que, en cooperación con otras citoquinas como por ejemplo la IL-15, participaría en la patogénesis de la EC (14). En un estudio en niños con EC, en el cual se evaluaron los niveles de IL-6, del receptor soluble de la IL-2 (sIL-2R) y del factor de necrosis tumoral (TNF) α como marcadores de actividad de EC se observaron niveles elevados de IL-6 y del sIL-2R en pacientes que no realizaron una DLG en comparación con aquellos que cumplieron la DLG y en sujetos controles pareados por sexo y edad. En estos últimos, se observaron valores aún menores que en los niños celíacos que cumplieron o no la DLG (14). Por otro lado, Nilsen y col., al exponer la mucosa de pacientes celíacos al gluten, observaron que se estimulaba la expresión de IL-6 y TNF-α in vitro (15). La concentración de estas interleuquinas estuvo incrementada en pacientes con EC activa en comparación con sujetos sanos y disminuyeron luego de un año bajo una DLG (16,17). La presencia de polimorfismos genéticos de estas citoquinas podrían modificar sus niveles y contribuir de manera relevante a la susceptibilidad para la EC (18).

La presencia de anemia que se asociada a la EC también podría constituir un factor de riesgo de ECV en estos pacientes. Estudios previos indican que aproximadamente entre un 20%-50% de los pacientes con EC presentan anemia al diagnóstico y, entre estos casos, más del 40% es atribuible a la deficiencia de hierro (19). Cabe destacar que, en adultos, la anemia por deficiencia de hierro ha sido asociada a inflamación específica vascular y a diversas alteraciones proaterogénicas (20).

Respecto al perfil de lípidos y lipoproteínas, Rosenthal y col. (21) observaron que, al diagnóstico, niños con EC, presentaban niveles plasmáticos significativamente más bajos de triglicéridos (TG) y de apolipoproteína (apo) A-I, y mayor concentración de colesterol de la lipoproteína de baja densidad (LDL) al compararlos con un grupo control. Posiblemente, una mayor tasa de depuración y menor contenido proteico en las HDL fuesen las causas de la menor concentración de TG y apo A-I, respectivamente. A su vez, estos autores atribuyeron el incremento de C-LDL a una mayor síntesis hepática de colesterol o a una reducida utilización periférica del mismo por un estado general de mala absorción (22). En un trabajo previo llevado a cabo en pacientes adultos con enfermedad celíaca en comparación con controles sanos, hemos observado una disminución significativa de los niveles de C-HDL y de apo A-I, asociada a una ligera alteración del metabolismo de los hidratos de carbono y a un estado proinflamatorio (22). También, se ha reportado que en pacientes adultos, a los 6 meses de iniciado el tratamiento con DLG, los niveles del C-HDL aumentan significativamente (23). Por otro lado, en una población pediátrica, se ha observado que, tras una DLG administrada durante un año, se produjo un aumento de los niveles de C-HDL y una disminución de los TG, sin cambios en el colesterol total (CT). Al considerar el sexo en esta población pediátrica, se observaron diferencias en el perfil de lípidos, presentando las niñas mayores niveles de CT y de C-HDL que los varones (23,24). Es de remarcar que la HDL no solo posee un rol esencial en el transporte inverso del colesterol, sino que también posee importantes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas (25). Se ha demostrado que la composición lipídica y apoproteica de las distintas lipoproteínas es determinante de su funcionalidad (26,27). De esta manera, es indispensable no solo la caracterización

química de las HDL, sino también la evaluación de la actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP), encargada de su remodelamiento en circulación (28), y de la enzima paraoxonasa, en gran parte responsable de su capacidad para inhibir la oxidación de las LDL (29). Por último, el estudio directo de la funcionalidad de la HDL para promover el eflujo de colesterol celular, primer paso de la vía antiaterogénica llamada transporte inverso del colesterol, y su rol antioxidante constituirían aportes valiosos para identificar las causas del desarrollo de aterosclerosis en pacientes con EC. La evaluación de las HDL, más allá de su nivel plasmático. cobra mayor relevancia desde que se ha comenzado a cuestionar la clásica "hipótesis de HDL" que relaciona los niveles de C-HDL inversamente con la ECV aterosclerótica y se ha comenzado a atribuir un rol causal a su capacidad para inducir la salida de colesterol libre de los macrófagos, dando lugar a la "hipótesis del eflujo de HDL (30,31).

Es destacable, que la mayor parte de los casos de EC diagnosticados en niños y adultos, actualmente carecen de los síntomas gastrointestinales típicos y, en cambio, son muy frecuentes otras formas de presentación denominadas atípicas o extraintestinales, representando uno de los principales desafíos para el profesional de la salud (32,33).

Por lo antes expuesto, en niños con EC, surge la necesidad de estimar exhaustivamente el riesgo de desarrollo de ECV a través de la evaluación de sus factores de riesgo nóveles o emergentes y de sus biomarcadores, así como de caracterizar el proceso inflamatorio y la capacidad antiaterogénica de la HDL. Adicionalmente, es relevante determinar las asociaciones existentes entre los diversos signos clínicos asociados al establecimiento de la enfermedad y los distintos biomarcadores evaluados. La cronicidad de la EC resalta la importancia de identificar a los agentes causales de ECV, para entonces poder implementar estrategias preventivas cuya eficacia ya ha sido ampliamente comprobada en otras patologías o sea cuando la aterosclerosis aún se encuentra en la etapa subclínica.

OBJETIVOS

En niños con EC al momento del diagnóstico y luego de 6 meses de realizar una DLG, y en sujetos controles:

1. Analizar características antropométricas y evaluar signos y síntomas clínicos típicos de EC.
2. Evaluar los marcadores de resistencia insulínica (concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina, además de los índices Homeostasis Model Assessment (HOMA) y Quantitative Sensitivity Check Index (QUICKI).
3. Medir parámetros hematológicos y férricos (niveles plasmáticos de ferremia y ferritina, y saturación de transferrina) y determinar la presencia de anemia.
4. Analizar el perfil de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas.
5. Caracterizar el estado inflamatorio a través de marcadores específicos generales como los niveles plasmáticos de PCRus y la actividad de Lp-PLA2.
6. Analizar la relación existente entre la forma de presentación de la EC, sus signos y síntomas, el perfil lipoproteico y los marcadores de inflamación general y vascular.
7. Evaluar el efecto de la DLG sobre los parámetros antes mencionados

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: a) Estudios transversal en el cual se compararán pacientes pediátricos con EC y controles, y b) Estudio longitudinal en el cual se evaluará el efecto de una DLG durante 6 meses en los niños con EC seleccionados. El presente proyecto cuenta con la aprobación del Comité de ética del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan.

Sujetos: Se estudiarán niños con EC de ambos sexos con edades comprendidas entre 3 y 12 años, los cuales serán diagnosticados en base a hallazgos histológicos de atrofia vellositaria, que detecte evidencias de enteropatía compatible con EC, y presencia de serología específica (anticuerpos clase IgA e IgG anti-gliadina e IgA anti-transglutaminasa elevados). Los mismos serán categorizados de acuerdo a la presentación clínica en clásicos o sintomáticos, atípicos y silentes. Serán excluidos del estudio aquellos pacientes que presenten: a) deficiencia de IgA, b) alteraciones tiroideas, renales, hepáticas, antecedentes de ECV, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal, EC complicada, y enfermedades malignas, y c) tratamiento farmacológico que pueda afectar el metabolismo lipídico o glucídico. Los sujetos controles fueron reclutados de la población o comunidad de procedencia de los casos, que no tuvieran sospecha ni diagnóstico de ninguna patología y con edades similares a los pacientes. Fijando un 80% de potencia y una significación de 0,05 para las variables principales, se estimó que el tamaño muestral debía ser de al menos 20 pacientes y 20 controles.

Examen clínico y procesamiento de las muestras: Se registrará la edad, el peso, la talla y la circunferencia de cintura. Se efectuarán las extracciones de sangre luego de 12 hs. de ayuno y se colocarán alícuotas en tubos con acelerador de la coagulación y con EDTA. Se separará el suero y se conservarán alícuotas a 4º C y a –70º C.

Niveles de glucosa, insulina e índices de resistencia/sensibilidad insulínica: Los niveles plasmáticos de glucosa se determinarán por un método estandarizado (Roche Diagnostics, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501. Se medirá la concentración plasmática de insulina con un inmunoensayo quimioluminiscente (Inmulite, Siemmens, EEUU). Se calcularán los índices glucosa/insulina, HOMA-IR, mediante la fórmula Glucosa (mmol/l). Insulina (uU/ml)/22,5 y QUICKI mediante la fórmula 1/ln Glucosa (mmol/l)+ln Insulina (mU/l), indicadores de resistencia y sensibilidad insulínica, respectivamente.

Parámetros hematológicos y férricos: Se realizará el hemograma completo y se medirán la ferremia, la transferrina y la ferritina por métodos estandarizados. Se calculará el porcentaje de saturación de transferrina.

Perfil de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas: Los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total, C-HDL, colesterol de lipoproteínas de baja densidad se determinarán por métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501. El dosaje de apo B y apo A-I se realizó por inmunoturbidimetría (Roche Diagnostics, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501. Se calculó el colesterol-no-HDL como la diferencia entre el colesterol total y el C-HDL. Se obtuvo el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (C-VLDL) por diferencia entre el colesterol de los sobrenadantes de las determinaciones de C-LDL y de C-HDL.

Marcadores de inflamación: Se determinará la concentración de PCRus por un ensayo inmunoturbidimétrico ultrasensible (Roche Diagnostics, Suiza) en un autoanalizador COBAS C 501. Se medirá la actividad de la Lp-PLA2 por método radiométrico desarrollado (34).

Análisis estadístico: La distribución de los datos será analizada mediante el test de Shapiro Wilk. Los datos serán expresados como Media±DE (distribución paramétrica) o como Mediana y rango (distribución no paramétrica). Para evaluar diferencias entre grupos, se emplearán métodos paramétricos o no paramétricos, según corresponda. Se implementará regresión simple y múltiple para la asociación entre parámetros. Las diferencias serán consideradas significativas con un $p<0,05$ en la situación bilateral (2 colas). Se utilizarán los programas SPSS 19.0, Infostat y OpenEpi.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados de parámetros bioquímicos generales, del metabolismo de los hidratos de carbono y del perfil de lípidos. Se puede observar que el grupo de pacientes presenta menor nivel de C-HDL y de la apolipoproteína A-1. El índice de Castelli (CT/C-HDL) fue mayor en el grupo de pacientes y es considerado un predictor de enfermedad cardiovascular. A diferencia de lo observado por Rosenthal y col. que, al diagnóstico, niños con EC, presentaban niveles plasmáticos significativamente más bajos de triglicéridos (TG) y de apolipoproteína (apo) A-I, y mayor concentración de colesterol (C) de la lipoproteína de baja densidad (LDL) al compararlos con un grupo control, en el presente estudio solo se observó una disminución del C-HDL y apo A1. Posiblemente, una mayor tasa de depuración y menor contenido proteico en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) podrían ser las causas de la menor concentración de TG y apo A-I, respectivamente. Los autores atribuyeron el incremento de C-LDL a una mayor síntesis hepática de colesterol o a una reducida utilización periférica del mismo por un estado general de mala absorción (21).

Tabla 1: Características bioquímicas generales de pacientes con EC en comparación con sujetos controles.

	Pacientes celíacos (n=22)	**Controles (n=22)**	**P**
Edad (años)	8,1 (6,6 – 13,5)	5,0 (4,0 - 6,0)	<0,001
Sexo (F/M)	17/5	10/12	<0,001
z-IMC	0,6 (-0,6 – 1,2)	0,5 (0,2 – 1,9)	NS
Circunferencia de cintura (cm)	62 ± 14	53 ± 4	NS
Talla (m)	1,3 (1,1 – 1,4)	1,1 (1,1 – 1,4)	NS
Peso (Kg)	27,1 (18,8 – 40,5)	20,5 (18,3 – 23,5)	NS
Glucosa (mg/dl)	88 ± 10	85 ± 10	NS
Triglicéridos (mg/dl)	65 (54 - 101)	56 (40 - 78)	NS
Colesterol Total (mg/dl)	156,6 ± 33,5	152,3 ± 21,4	NS
C-HDL (mg/dl)	40,8 ± 10	47,4 ± 8	<0,05

C-LDL (mg/dl)	98,7 ± 26	92,3 ± 18	NS
C-no-HDL (mg/dl)	115 ± 28	106 ± 21	NS
C-VLDL (mg/dl)	13 (12 - 20)	11 (9 - 16)	NS
APO A-1 (mg/dl)	109 (103 - 136)	128 (121 - 152)	<0,05
APO B (mg/dl)	78 ± 18	70 ± 16	NS
APO A-1/APO B	1,5 (1,2 - 2)	2 (1,5 – 2,4)	<0,05
APO B/APO A-1	0,7 (0,5 – 0,8)	0,5 (0,4 – 0,7)	<0,05
CT/C-HDL	3,9 ± 0,7	3,3 ± 0,6	<0,005
PCRus (mg/dl)	0,5 (0,2 – 1,1)	1,2 (0,3 – 3,3)	NS

IMC, índice de masa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; apo, apolipoproteína; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media ± desvío estándar (DE) o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

En la tabla 2 podemos observar los parámetros hematológicos, del metabolismo del hierro y hepáticos de los pacientes pediátricos comparados con el grupo control. Cabe resaltar que la mayoría de los pacientes con EC presentaban anemia.

Tabla 2. Parámetros hematológicos, del metabolismo del hierro y hepáticos de pacientes con EC en comparación con sujetos controles.

	Pacientes celíacos (n=22)	**Controles (n=22)**	**p**
Gr (10^3cel/ml)	4,5 (4,1 – 4,7)	4,8 (4,7 – 4,9)	<0,001
Gb (10^3cel/ml)	8,3 (6,5 – 9,1)	8,3 (6,9 – 9,05)	NS
Hematocrito (%)	36,5 ± 4,2	37,3 ± 2,1	NS
Hemoglobina (g/dl)	12,2 ± 1,7	12,7 ± 0,8	NS
Ferremia (ug/dl)	59 ± 29	80 ± 30	<0,05
Saturación Tf (%)	17,5 ± 9,2	25,6 ± 9,9	<0,05
Ferritina (ng/ml)	22 ± 17	30 ± 13	NS
ASAT (UI/l)	29 (21 - 39)	12 (11 - 13)	<0,001
ALAT (UI/l)	22 (13 - 34)	27 (24 - 78)	NS
FAL (UI/l)	215 ± 66	223 ± 43	NS

Gr, glóbulos rojos; Gb, glóbulos blancos; Tf, transferrina; ASAT, aspartatoaminotransferasa; ALAT, alaninaaminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media ± desvió estándar (DE) o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Se observa en el grupo de pacientes con EC mayor actividad de Lp-PLA2 y de ARE (figuras 1 y 2) con respecto a los sujetos controles. La actividad de PON y CETP (figuras 2 y 3) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

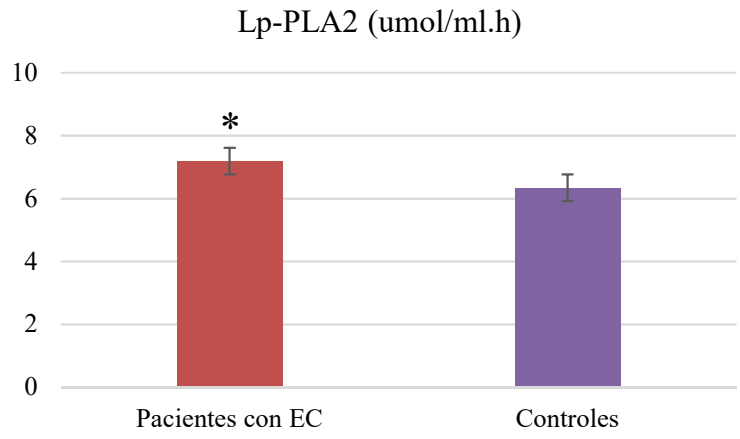


Figura 1: Actividad de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) en pacientes con EC comparados con sujetos controles pareados por sexo y edad. *p<0,05.

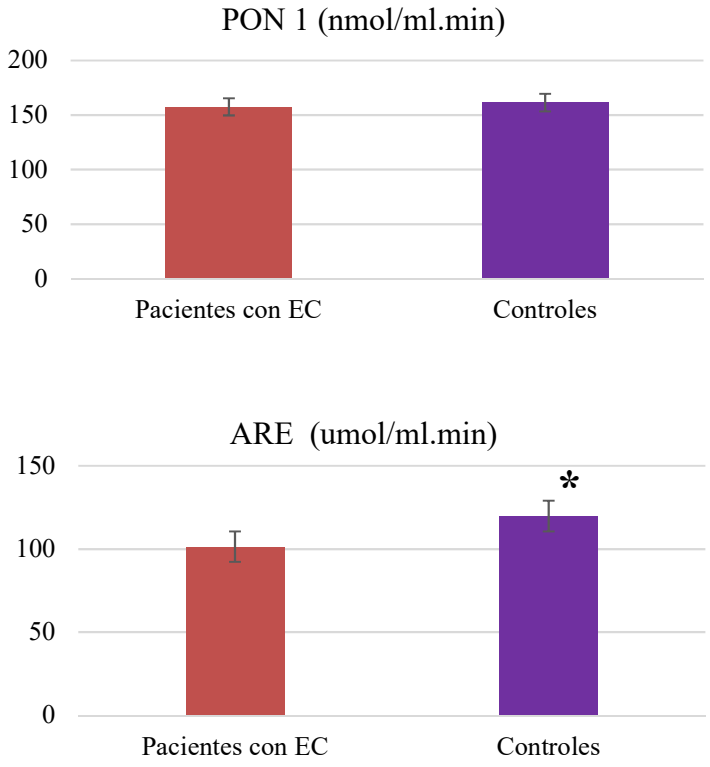


Figura 2: Actividad enzimática de la paraoxonasa (PON 1) y de la arilesterasas (ARE) en pacientes con EC comparados con sujetos controles pareados por sexo y edad. *p<0,05.

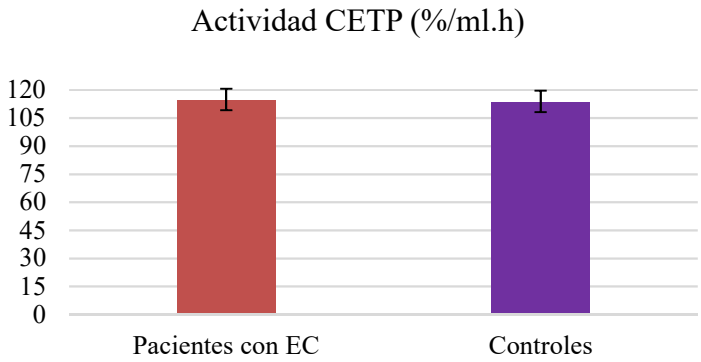


Figura 3: Actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) en pacientes con EC comparados con sujetos controles.

En la tabla 3 pueden observarse distintos parámetros bioquímicos luego de realizada la DLG, por un período de 6 meses.

Tabla 3: Pacientes con EC parámetros bioquímicos basales y luego de 6 meses de realizar una DLG.

	Basal (n=11)	**6 meses DLG (n=11)**	**P**
Glucosa (mg/dL)	82 ± 12	89 ± 6	<0.05
Triglicéridos (mg/dL)	64 (54 - 110)	47 (43 - 59)	<0.05
Col Total (mg/dL)	146 ± 32	153 ± 36	NS
C- HDL (mg/dL)	42 ± 12	45 ± 12	<0.05
C-LDL (mg/dL)	88 ± 24	95 ± 28	NS
PCRus (mg/dL)	0,4 (0,2 – 0,6)	0,3 (0,1 – 0,4)	NS
APO A-I (mg/dL	115 ± 25	124 ± 13	NS
APO B (mg/dL)	69 ± 15	82 ± 22	NS
APO A-1/APO B	1,71 ± 0,37	1,74 ± 0,42	NS
APO B/APO A-1	0,61 ± 0,15	0,61 ± 0,18	NS
C-no-HDL (mg/dl)	107 (75 - 124)	104 (78 - 125)	NS
C-VLDL (mg/dl)	12,8 (10,8 - 22)	9,4 (8,6 – 11,8)	NS
CT/C-HDL	3,54 (3,29 - 4)	3,12 (3,07 – 3,69)	NS
PCRus (mg/dl)	0,73 ± 1,05	0,79 ± 1,47	NS

HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; apo, apolipoproteína; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media ± desvío estándar (DE) o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Se observó un aumento de los niveles de glucosa, y C-HDL y disminución de la concentración de triglicéridos luego de la DLG, sin presentar los otros parámetros diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 4 se pueden observar parámetros hematológicos, del metabolismo del hierro y hepáticos basales y luego de 6 meses de DLG en los pacientes con EC.

Tabla 4: Pacientes con EC. Parámetros hematológicos, del metabolismo del hierro y hepáticos basales y luego de 6 meses de realizar una DLG.

	Basal (n=11)	**6 meses DLG (n=11)**	**P**
Gr (10^3cel/ml)	4,4 (4,1 – 4,7)	4,8 (4,3 – 5,1)	NS
Gb (10^3cel/ml)	7,9 ± 4,4	8,7 ± 2,1	NS
Hematocrito (%)	35,9 ± 3,8	37,7 ± 3,5	<0,05
Hemoglobina (g/dl)	11,9 ± 1,6	12,2 ± 1,5	NS
Hierro (ug/dl)	56 ± 26	68 ± 26	NS
Transferrina (ug/dl)	271 (229 - 303)	265 (244 - 342)	NS
Ferritina (ng/ml)	13 (5 - 27)	25 (6 - 27)	NS
Saturación Tf (%)	17 ± 9	19 ± 8	NS
ASAT (UI/l)	29 (21 - 39)	25 (18 - 48)	NS
ALAT (UI/l)	20 (13 - 41)	19 (14 - 42)	NS
FAL (UI/l)	215 ± 59	206 ± 84	NS

Gr, glóbulos rojos; Gb, glóbulos blancos; Tf, transferrina; ASAT, aspartatoaminotransferasa; ALAT, alaninaaminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media ± desvió estándar (DE) o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

El hematocrito fue el único parámetro que mostró un incremento luego de 6 meses con DLG.

Luego de la DLG se observa un marcado incremento de la actividad de PON 1 figura (4 A) pero sin diferencias significativas de la actividad ARE figura (4 B).

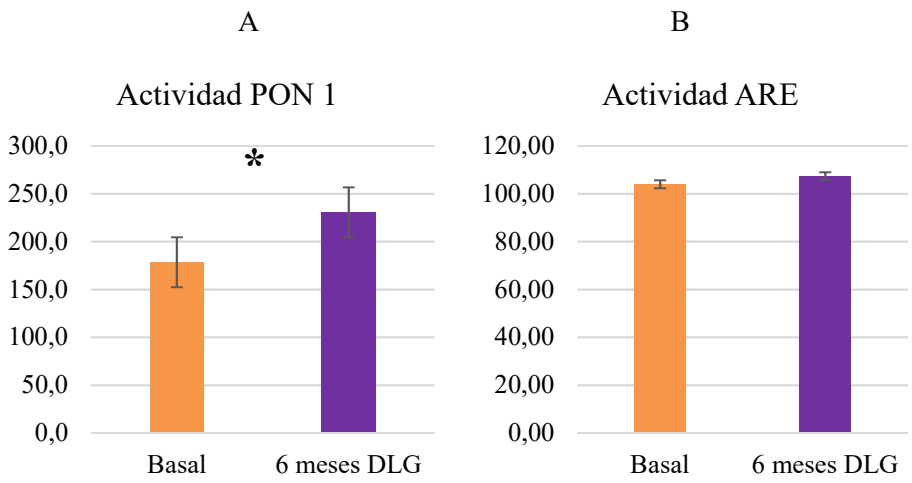


Figura 4: Actividad enzimática de la paraoxonasa (PON 1) y de la arilesterasas (ARE) en pacientes con EC antes y después de una DLG. *p<0,05

La actividad de la Lp-PLA2 (figura 5) y de CETP (figura 6), no mostraron diferencias estadísticamente significativas antes y después de la DLG.

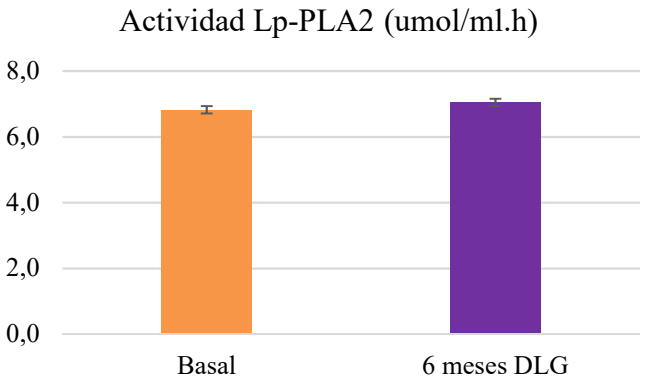


Figura 5: Actividad de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) en pacientes con EC antes y después de la DLG.

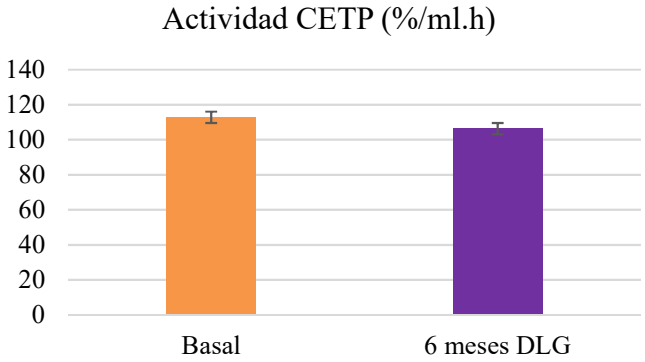


Figura 6: Actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) en pacientes con EC antes y después de la DLG.

La actividad de la Lp-PLA2 correlacionó positivamente con CT (r=0.47; p<0,001), C-LDL (r=0.53; p<0,001), C-noHDL (r=0,53; p<0,001), apo B (r=0,59; p<0.001), apo A-1/Apo B (r=-0,5; p<0,001).

La actividad de PON 1 se asoció a apo A-I/apo B (r=0,31; p<0,05). La actividad ARE correlacionó con C-HDL (r=0,50; p<0,001), apo A-I (r=0,53; p<0,001) y PON 1 (r=0,36; p<0,05), Apo A-1/Apo B (r=0,42; p<0,01). No se observaron asociaciones significativas para la actividad de CETP.

DISCUSIÓN

En este trabajo se puede observar que los niños con reciente diagnóstico de EC mostraron una tendencia a desarrollar un perfil de lípidos más aterogénico, con mayores niveles de TG, C-LDL, C-noHDL, C-VLDL que los sujetos controles como así también, un mayor índice CT/C-HDL, predictor de desarrollo aterosclerótico temprano (35). La menor concentración de C-HDL, Apo A-1 y un menor índice Apo A-1/Apo B confirmarían este perfil, sobre todo si se tiene en cuenta que el transporte de lípidos por parte de la HDL, estimulado por la Apo A1, es el mayor responsable del efecto protector de la HDL contra la aterosclerosis (36).

Por otro lado, en este grupo de pacientes con EC la presencia de una menor concentración de glóbulos rojos, de hierro en circulación y de saturación de transferrina revelaría la presencia de anemia y probablemente mayor susceptibilidad a daño oxidativo como se observó en sujetos de edad avanzada con anemia leve (37,38).Se ha descrito también, que, en pacientes con anemia ferropénica, los agentes pro-oxidantes incrementan con respecto a los antioxidantes, teniendo como resultado un balance positivo hacia el lado oxidativo (39). Según algunos autores, la presencia de anemia constituye un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular (40) y una deficiencia crónica de hierro con anemia, puede acelerar el desarrollo de enfermedad cardiovascular (41).

En pacientes celiacos, es frecuente observar alteraciones hepáticas, sin embargo, los mecanismos patogénicos son poco conocidos. Una de las hipótesis más aceptadas está basada en que el incremento de la permeabilidad intestinal observada en los pacientes celiacos podría favorecer la absorción de antígenos procedentes del intestino a través de la circulación portal y generar una respuesta inmune dirigida contra antígenos que comparten epítopes propios de las proteínas hepáticas y/o contra antígenos de la mucosa intestinal (42). Se trata de una reacción inflamatoria que se produce en el hígado y que se caracteriza por una infiltración de células inflamatorias en los espacios periportales y que no responde a ningún otro patrón. En los pacientes celiacos evaluados en este trabajo, se observó un incremento de los niveles de aspartatoaminotransferasa (ASAT) en comparación con el grupo control, marcando posiblemente el inicio de una reacción inflamatoria hepática.

Asimismo, desde que Mackness y col. (43) sugirieron que la enzima PON-1 podría ser capaz de impedir o limitar la oxidación de las LDL, se comenzó a entender la importancia clínica de esta enzima, dada la relación entre el estrés oxidativo, la oxidación del LDL y la aterosclerosis. La evaluación de esta enzima a través de su actividad PON y ARE en niños con EC mostró una menor actividad arilesterasa con una actividad paraoxonasa sin cambios significativos, en relación con el grupo control. Dado que ARE refleja mejor la concentración de la enzima y PON su actividad antioxidante (44), estos resultados estarían sugiriendo que en niños con EC con una disminución de la concentración podría ser un indicador temprano en las modificaciones de las HDL.

La aterosclerosis se considera un proceso inflamatorio muy complejo, en el cual participan diversas biomoléculas. Una de ellas, la Lp-PLA2, que modifica los fosfolípidos en las partículas de LDL y genera especies aterogénicas (45), presentó mayor actividad en los niños con EC que en los controles, reflejando en parte el estado inflamatorio y resultando más sensible que la PCRus en este grupo de pacientes.

En los niños con EC, que realizaron durante 6 meses una DLG, se observó una disminución de los niveles de TG, un incremento de la concentración de HDL y una mayor actividad de PON lo que podría estar indicando una mayor capacidad antioxidante de esa lipoproteína, con posible disminución de partículas aterogénicas y del riesgo cardiovascular.

Los pacientes celiacos en este estudio presentaron mayores niveles de glucosa luego de la DLG. Cabe resaltar que, con la exclusión del gluten de la dieta, la mucosa intestinal se recupera, aumentando así la capacidad de absorción intestinal, que puede ser responsable de alteraciones del metabolismo por el consumo excesivo de productos libres de gluten. Estos productos, sin gluten, tienen un mayor contenido de grasas saturadas, azúcares simples y sal, y por lo tanto proporcionan una ingesta con alto contenido calórico que puede dar lugar a importantes modificaciones metabólicas (46).

CONCLUSIONES

Al comparar los pacientes celíacos con un grupo control se puede observar un perfil más aterogénico el cual podría agravarse con el correr de los años e incrementar el riesgo de ECV si no son tratados adecuadamente. En el estudio longitudinal a los 6 meses de una DLG se observa una mejoría en el perfil lipoproteico, pero debe tenerse en cuenta que la DLG debe ser perfectamente balanceada y controlada para evitar la aparición de otros trastornos metabólicos.

RESUMEN

Existe cada vez más evidencia que, tanto en niños como en adultos, la enfermedad celíaca (EC) podría asociarse con factores de riesgo aterogénico no identificados y, en consecuencia, con enfermedad cardiovascular. En este contexto, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) constituyen la única fracción antiaterogénica, siendo la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) una de sus funciones principales. Esta capacidad antioxidante depende de varios componentes asociados a la HDL, como ser la enzima paraoxonasa 1 (PON1). Por otro lado, la EC se caracteriza por la inflamación de la mucosa del intestino delgado como consecuencia de una intolerancia inmunológica al gluten. Al tener la inflamación un papel establecido, en el inicio y la progresión del proceso aterosclerótico, resulta relevante investigar marcadores de inflamación como la proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) y la actividad de la enzima fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2). Los objetivos de este trabajo son: 1) evaluar la relación entre la EC y la presencia de factores de riesgo aterogénico en niños recientemente diagnosticados en comparación con controles sanos, y 2) el efecto de la dieta libre de gluten (DLG).

El estudio incluyó 22 niños con EC y 22 sujetos controles entre 3 y 13 años. Once de los niños con EC completaron 6 meses de DLG. Se cuantificaron los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), c-HDL, c-LDL, apolipoproteínas A-I y B,

glucosa y parámetros hematológicos por métodos estandarizados. Se calculó el índice CT/C-HDL (indicador de riesgo aterogénico). La proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP) se evaluó por un método radiométrico y la actividad de la enzima antioxidante paraoxonasa (PON) 1 se midió por un ensayo colorimétrico empleando dos sustratos: paraoxon (actividad PON) y fenilacetato (actividad ARE). La concentración de PCRus se determinó por un método estandarizado y la actividad de la Lp-PLA2 por un método radiométrico.

Se observo diferencias significativas en la edad entre los niños con EC y los controles, por lo que los análisis estadísticos se realizaron ajustando por edad. Los niños con EC mostraron menor concentración de C-HDL, de hierro en plasma, de saturación de transferrina, de la actividad de ARE y mayor actividad de Lp-PLA2 ($p < 0.05$) en comparación con los controles. Con respecto al análisis longitudinal, tanto los niveles de C-HDL como la actividad de PON1 aumentaron mientras que, la concentración TG disminuyó después de 6 meses de la DLG ($p < 0.05$). Después del tratamiento, con la DLG, los niveles de C-HDL de los niños con EC resultó ser similar a los observados en los sujetos control. Al comparar los pacientes celíacos con el grupo control se puede observar la presencia de un perfil más aterogénico el cual podría agravarse con el correr de los años e incrementar el RCV si no son tratados adecuadamente. En el estudio longitudinal a los 6 meses de una DLG se observa una mejoría en el perfil lipoproteico, pero debe tenerse en cuenta que la DLG debe ser perfectamente balanceada y controlada para evitar la aparición de otros trastornos metabólicos.

ABSTRACT

There is increasing evidence that in children and adults, celiac disease (CD) could be associated with unidentified atherogenic risk factors and consequently, with cardiovascular disease. In this context, high density lipoproteins (HDL) constitute the only antiatherogenic fraction, being one of its main functions the inhibition of oxidation of low-density lipoproteins (LDL). This antioxidant capacity depends on several components associated with HDL, such as the enzyme paraoxonase 1 (PON1). On the other hand, CD is characterized by inflammation of the mucosa of the small intestine as a result of an immune intolerance to gluten. Since inflammation has an established role, at the onset and progression of the atherosclerotic process, it is relevant to investigate inflammation markers such as ultrasensitive C-reactive protein (PCRus) and the activity of lipoprotein-associated phospholipase A2 enzyme (Lp-PLA2). The objectives of this work are: 1) to evaluate the relationship between CD and the presence of atherogenic risk factors in recently diagnosed children compared to healthy controls, and 2) the effect of gluten-free diet (DLG).

The study included 22 children with CD and 22 subjects controls between 3 and 13 years old. Eleven of the children with CD completed 6 months of DLG. Plasma triglyceride levels (TG), total cholesterol (CT), c-HDL, c-LDL, apolipoproteins A-I and B, glucose, hematological parameters were measured by standardized methods. The CT / C-HDL index (atherogenic risk indicator) was calculated. The cholesterol esters transporter protein (CETP) was evaluated by a radiometric method and the activity of the antioxidant enzyme paraoxonase (PON) 1 was measured by a colorimetric assay using two substrates: paraoxon (PON activity) and phenylacetate (ARE activity). The concentration of PCRus was determined by a standardized method and the activity of Lp-PLA2 by a radiometric method.

Significant differences in age were observed between children with CD and controls, so statistical analyzes were performed adjusting for age. Children with CD showed lower concentration of C-HDL, iron in plasma, transferrin saturation, ARE activity and higher Lp-PLA2 activity ($p < 0.05$) compared to controls. With respect to the longitudinal analysis, both C-HDL levels and PON1 activity increased while, the TG concentration decreased after 6 months of DLG ($p < 0.05$). After treatment, with DLG, C-HDL levels of children with CD turned out to be similar to those observed in control subjects. When comparing celiac patients with the control group, the presence of a more atherogenic profile can be observed, which could worsen over the years and increase the CVR if they are not treated properly. In the longitudinal study at 6 months of a DLG an improvement in the lipoprotein profile is observed, but it should be taken into account that the DLG must be perfectly balanced and controlled to avoid the appearance of other metabolic disorders.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. abril de 2010;7(4):204-13.
2. Malamut G, Cording S, Cerf-Bensussan N. Recent advances in celiac disease and refractory celiac disease. F1000Res. 2019;8: 1-12.
3. Armstrong MJ, Hegade VS, Robins G. Advances in coeliac disease. Curr Opin Gastroenterol. marzo de 2012;28(2):104-12.
4. Mora M, Litwin N, Toca M del C, Azcona MI, Solís Neffa R, Battiston F, et al. Prevalence of celiac disease: multicentric trial among pediatric population from five urban districts in Argentina. Arch Argent Pediatr. diciembre de 2012;110(6):490-6.
5. Celiaquía | Argentina.gob.ar [Internet]. [citado 3 de febrero de 2020]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/salud/celiaquia
6. Kang JY, Kang AHY, Green A, Gwee KA, Ho KY. Systematic review: worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. Aliment Pharmacol Ther. agosto de 2013;38(3):226-45.
7. Al-Hussaini A, Troncone R, Khormi M, AlTuraiki M, Alkhamis W, Alrajhi M, et al. Mass Screening for Celiac Disease Among School-aged Children: Toward Exploring Celiac Iceberg in Saudi Arabia. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017;65(6):646-51.
8. Ludvigsson JF, de Faire U, Ekbom A, Montgomery SM. Vascular disease in a population-based cohort of individuals hospitalised with coeliac disease. Heart. septiembre de 2007;93(9):1111-5.
9. Bolia R, Srivastava A, Kapoor A, Yachha SK, Poddar U. Children with untreated coeliac disease have sub-clinical cardiac dysfunction: a longitudinal observational analysis. Scand J Gastroenterol. julio de 2018;53(7):803-8.
10. West J, Logan RFA, Card TR, Smith C, Hubbard R. Risk of vascular disease in adults with diagnosed coeliac disease: a population-based study. Aliment Pharmacol Ther. 1 de julio de 2004;20(1):73-9.

11. Tetzlaff WF, Meroño T, Menafra M, Martin M, Botta E, Matoso MD, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease in recently diagnosed celiac disease patients. World J Cardiol. 26 de mayo de 2017;9(5):448-56.
12. Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. Clin Chem. marzo de 2001;47(3):403-11.
13. van Leeuwen MA, Lindenbergh-Kortleve DJ, Raatgeep HC, de Ruiter LF, de Krijger RR, Groeneweg M, et al. Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease. Mucosal Immunol. noviembre de 2013;6(6):1202-13.
14. Kapoor A, Patwari AK, Kumar P, Jain A, Narayan S. Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as markers of celiac disease activity. Indian J Pediatr. febrero de 2013;80(2):108-13.
15. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. Gastroenterology. septiembre de 1998;115(3):551-63.
16. Clot F, Babron MC. Genetics of celiac disease. Mol Genet Metab. octubre de 2000;71(1-2):76-80.
17. Romaldini CC, Barbieri D, Okay TS, Raiz R, Cançado ELR. Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha levels in children with celiac disease: response to treatment. J Pediatr Gastroenterol Nutr. octubre de 2002;35(4):513-7.
18. Dema B, Martínez A, Fernández-Arquero M, Maluenda C, Polanco I, Figueredo MA, et al. The IL6-174G/C polymorphism is associated with celiac disease susceptibility in girls. Hum Immunol. marzo de 2009;70(3):191-4.
19. Harper JW, Holleran SF, Ramakrishnan R, Bhagat G, Green PHR. Anemia in celiac disease is multifactorial in etiology. Am J Hematol. noviembre de 2007;82(11):996-1000.
20. Chonchol M, Nielson C. Hemoglobin levels and coronary artery disease. Am Heart J. marzo de 2008;155(3):494-8.
21. Rosenthal E, Hoffman R, Aviram M, Benderly A, Erde P, Brook JG. Serum lipoprotein profile in children with celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. julio de 1990;11(1):58-62.
22. Menafra M, Meroño T, Matoso MD, Boero LE, Gomez Rosso LA, Saez MS, et al. Aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedad celíaca. enero de 2013 [citado 30 de agosto de 2019]; Disponible en: http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/16909
23. Lewis NR, Sanders DS, Logan RFA, Fleming KM, Hubbard RB, West J. Cholesterol profile in people with newly diagnosed coeliac disease: a comparison with the general population and changes following treatment. Br J Nutr. agosto de 2009;102(4):509-13.
24. Forchielli ML, Fernicola P, Diani L, Scrivo B, Salfi NC, Pessina AC, et al. Gluten-Free Diet and Lipid Profile in Children With Celiac Disease: Comparison With General Population Standards. J Pediatr Gastroenterol Nutr. agosto de 2015;61(2):224-9.

25. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. Ann Rheum Dis. septiembre de 2012;71(9):1524-9.

26. Brites FD, Bonavita CD, De Geitere C, Cloës M, Delfly B, Yael MJ, et al. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. Atherosclerosis. septiembre de 2000;152(1):181-92.

27. Zea-Robles AC, León-Ariza HH, Botero-Rosas DA, Afanador-Castañeda HD, Pinzón-Bravo LA. [University students'' cardiovascular risk factors and their relationship with body composition]. Rev Salud Publica (Bogota). agosto de 2014;16(4):505-15.

28. Keene D, Price C, Shun-Shin MJ, Francis DP. Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. BMJ. 18 de julio de 2014;349:g4379.

29. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. Gene. 1 de agosto de 2015;567(1):12-21.

30. Siddiqi HK, Kiss D, Rader D. HDL-cholesterol and cardiovascular disease: rethinking our approach. Curr Opin Cardiol. septiembre de 2015;30(5):536-42.

31. Anastasius M, Kockx M, Jessup W, Sullivan D, Rye K-A, Kritharides L. Cholesterol efflux capacity: An introduction for clinicians. Am Heart J. 2016;180:54-63.

32. Katz KD, Rashtak S, Lahr BD, Melton LJ, Krause PK, Maggi K, et al. Screening for celiac disease in a North American population: sequential serology and gastrointestinal symptoms. Am J Gastroenterol. julio de 2011;106(7):1333-9.

33. Hill ID, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg E, Levy J, Reilly N, et al. NASPGHAN Clinical Report on the Diagnosis and Treatment of Gluten-related Disorders. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2016;63(1):156-65.

34. Blank ML, Hall MN, Cress EA, Snyder F. Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. Biochem Biophys Res Commun. 15 de junio de 1983;113(2):666-71.

35. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 25 de junio de 2019;73(24):e285-350.

36. Houterman S, Boshuizen HC, Verschuren WMM, Giampaoli S, Nissinen A, Menotti A, et al. Predicting cardiovascular risk in the elderly in different European countries. Eur Heart J. febrero de 2002;23(4):294-300.

37. Coghetto Baccin A, Lauerman Lazzaretti L, Duarte Martins Brandao V, Manfredini V, Peralba MCR, Silveira Benfato M. Oxidative stress in older patients with iron deficiency anaemia. J Nutr Health Aging. octubre de 2009;13(8):666-70.

38. Martín-Masot R, Nestares MT, Diaz-Castro J, López-Aliaga I, Alférez MJM, Moreno-Fernandez J, et al. Multifactorial Etiology of Anemia in Celiac Disease and

Effect of Gluten-Free Diet: A Comprehensive Review. Nutrients. 23 de octubre de 2019;11(11).

39. Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, Ozgonül S, Celik H, Celik M, et al. Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. Mutat Res. 10 de octubre de 2006;601(1-2):144-9.
40. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. The ARIC investigators. Am J Epidemiol. abril de 1989;129(4):687-702.
41. Liu Q, Sun L, Tan Y, Wang G, Lin X, Cai L. Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. Curr Med Chem. 2009;16(1):113-29.
42. Cantarero Vallejo MD, Gómez Camarero J, Menchén L, Pajares Díaz JA, Lo Iacono O. [Liver damage and celiac disease]. Rev Esp Enferm Dig. noviembre de 2007;99(11):648-52.
43. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett. 29 de julio de 1991;286(1-2):152-4.
44. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R, Hokanson JE, et al. Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. Arterioscler Thromb Vasc Biol. octubre de 1996;16(10):1243-9.
45. Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mayo de 2005;25(5):923-31.
46. Ciccone A, Gabrieli D, Cardinale R, Di Ruscio M, Vernia F, Stefanelli G, et al. Metabolic Alterations in Celiac Disease Occurring after Following a Gluten-Free Diet. Digestion. 2019;100(4):262-8.

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE POLIOMAVIRUS HUMANOS CON TROPISMO CUTÁNEO EN ARGENTINA

Carolina Torres

Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires

Los poliomavirus son virus pequeños, desnudos, con genoma de ADN circular de doble cadena, de entre 4,8 y 5,5 kpb. La mayoría de los poliomavirus de mamífero codifican para proteínas oncogénicas que inducen transformaciones neoplásicas en cultivo de células y tumores en animales, incluyendo primates. Esta observación conlleva a una potencial asociación con patologías neoplásicas en humanos, por lo que el estudio de los poliomavirus ha cobrado particular relevancia para la salud pública.

En la última década, se han descripto al menos once poliomavirus humanos que se han sumado a los ya conocidos poliomavirus JC (JCPyV) y BK (BKPyV). Entre ellos, se encuentran los virus Merkel-Cell (MCPyV), el poliomavirus asociado a la tricodisplasia espinulosa (TSPyV) y los poliomavirus humanos 6 (HPyV6) y 7 (HPyV7) que poseerían tropismo cutáneo (Torres, 2020). Algunos de los virus recientemente descriptos serían de alta prevalencia en la población, establecerían infecciones persistentes y presentarían manifestaciones clínicas en poblaciones específicas como individuos con inmunosupresión o edad avanzada.

El **objetivo general** del proyecto fue analizar la diversidad de los poliomavirus (PyV) humanos con tropismo cutáneo (MCPyV, TSPyV, HPyV6 y HPyV7) que circulan en población de Argentina y su posible asociación con distintas lesiones de piel.

Para ello, se analizaron las muestras provenientes de individuos inmunocompetentes obtenidas mediante un estudio transversal, en colaboración con el Servicio de Virus Oncogénicos del Departamento de Virología INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", a cargo de la Dra. María Alejandra Picconi. Las muestras correspondieron a hisopados de frente (piel sana, n=75) y biopsias de lesiones de distinta gravedad (queratosis actínica (QA), carcinomas de células basales (CCB), carcinomas de células escamosas (CCE) y otras (n=81), previamente estudiadas para la detección y caracterización de papilomavirus humanos cutáneos (HPVc). El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de la ANLIS-Malbrán.

La diversidad viral se analizó mediante técnicas de biología molecular desarrolladas previamente en esta línea de trabajo (Torres et al., 2018, 2016). El análisis de las variantes virales asociadas a los distintos tipos de lesiones se realizó por secuenciación, análisis bioinformáticos y estadísticos que permiten evaluar la relación filogenética de las variantes halladas en nuestro país con las descriptas en otros lugares del mundo.

La secuenciación del genoma completo viral de dos variantes posiblemente asociadas a un nuevo poliomavirus se realizó mediante el diseño de una PCR anidada de amplio rango (para obtener el genoma completo), previo paso de enriquecimiento con una reacción de Rolling Circle Amplification previamente diseñada también en esta línea de trabajo.

En muestras de piel sana, la detección de PyV alcanzó el 61,3 %, mientras que la presencia de dos PyV se observó simultáneamente en el 12,0 %. La mayor detección se encontró para MCPyV (58,7% de las muestras), seguido por HPyV6 (13,3%). A su vez, la detección de HPVc alcanzó el 81,3% de las muestras y se observó una alta proporción de co-detecciones PyV-HPVc (49,3%), que alcanzó el 80,4% entre las muestras PyV positivas.

Por otro lado, PyV se detectó en el 22,2% de las biopsias, mientras que la detección conjunta de dos PyV se observó en el 6,2%. Los PyV encontrados fueron MCPyV (19,8%) y HPyV6 (8,6%). Además, la detección de HPVc alcanzó el 40,7% y se observó co-detecciones PyV-HPVc en el 16,0% de las muestras, que alcanzó el 72,2% entre las muestras PyV positivas.

La detección de PyV se asoció con sexo femenino (OR=3,3, p=0,021, ajustado por edad y tabaquismo). De igual forma, la detección individual de MCPyV asociada al sexo femenino (OR=3,4, p=0,019, ajustado por edad, tabaquismo, detección de HPVc y detección de HPyV6). Mientras que la detección de HPyV6 se asoció con la detección conjunta de MCPyV-HPVc (OR = 6,0, p = 0,036, ajustado por edad y tabaquismo).

Por otro lado, la detección de PyV en muestras de biopsias se asoció con la detección de HPVc (OR=5,1, p=0,007, ajustado por sexo; y OR=6,0, p=0,025, ajustado por sexo y edad). Cabe señalar que, aunque la detección de PyV no se asoció con ningún tipo de lesión, en 5 de las 18 muestras PyV positivas se detectó MCPyV y no HPVc (co-detección MCPyV-HPyV6 en un caso), en muestras correspondientes a casos de QA (n=2) y CCB (n=3).

El análisis filogenético de las variantes virales de MCPyV y HPyV6 asociadas a los distintos tipos de lesiones mostró que las muestras pertenecieron a distintos genotipos o grupos, aunque no se observó una distribución de acuerdo con la lesión (Figura 1).

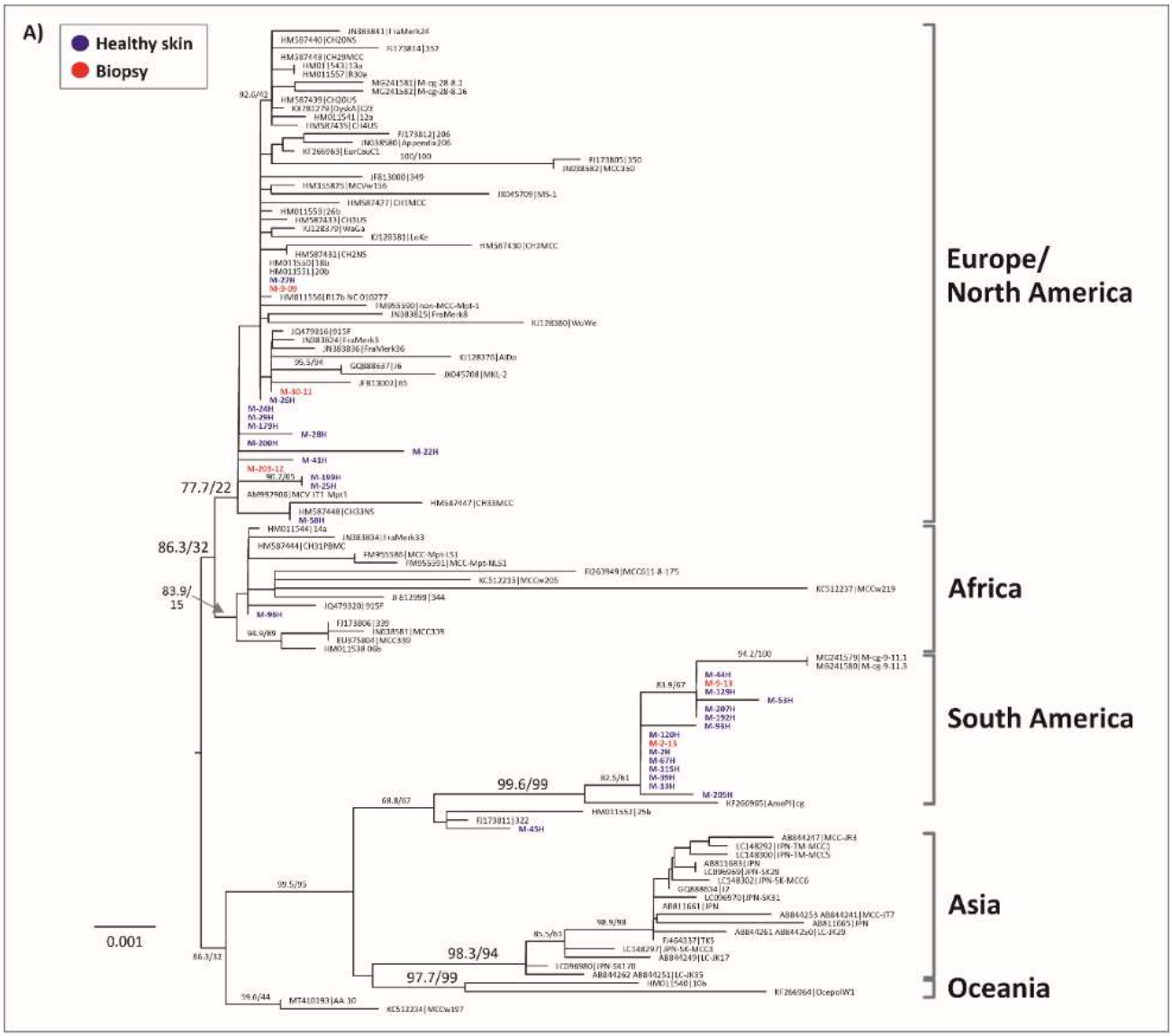

A)
Healthy skin
Biopsy
Europe/
North America
Africa
South America
Asia
Oceania
0.001
B)
Healthy skin
Biopsy
Group 1
(Worldwide)
Group 2
(Asia)
0.002

Figure 1. Árboles filogenéticos para secuencias completes y parciales del LT de MCPyV (A) y HPyV6 (B). Secuencias correspondientes a este trabajo se indican en colores. Los genotipos (MCPyV) o grupos (HPyV6) son indicados a la derecha del árbol.

Por otro lado, la caracterización molecular completa de una de las variantes virales encontradas como potenciales nuevos miembros de la familia *Polyomaviridae* mostró que cumple con los criterios para ser propuesto como un nuevo poliomavirus humano (Calvignac-Spencer et al., 2016). Brevemente, presenta más del 15% de divergencia respecto a otro poliomavirus humano en la región que codifica al LT (en aminoácidos) y presenta una clara separación filogenética. En caso de ser aceptado por el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), sería un nuevo miembro del género Delta en la familia *Polyomaviridae*.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la frecuencia de detección de HPyV (MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV) en piel sana y en muestras de biopsias de lesiones de diferente gravedad, incluyendo SCC y BCC, en población de Argentina.

MCPyV fue el HPyV más frecuentemente encontrado en piel sana, alcanzando el 58,7% de las muestras, proporción similar a la observada previamente en poblaciones de diversos orígenes (~40,0-69,2%) (Hampras et al., 2015; Hashida et al., 2016; Schowalter et al., 2010).

Este virus es el principal factor causante del MCC y, aunque se ha encontrado en muchos cánceres no MCC -incluido, entre otros, el NMSC-, no se encontró una asociación clara con su desarrollo (Csoboz et al., 2020). En este trabajo, MCPyV se encontró en el 23,8% de SCC y en el 18,8% de muestras de BCC, cerca de la prevalencia promedio de ~24,9-40% en NMSC estimada en otras poblaciones, revisada en (Csoboz et al., 2020).

En particular, se encontró MCPyV en cinco lesiones cutáneas que no presentaban HPVc detectable, correspondientes a tres casos de BCC (con un caso como MCPyV+/HPyV6+) y dos casos de QA.

Además, en este trabajo también se demostró que la detección de HPyV se asoció con la detección concomitante de HPVc en muestras de biopsia, lo que sugiere que una interacción entre estos virus puede tener lugar en los tejidos y potencialmente podría desempeñar un papel en el desarrollo de la enfermedad.

Finalmente, los poliomavirus con tropismo cutáneo son virus de alta prevalencia en la población argentina y podrían tener un papel individual o conjunto al HPVc en el desarrollo de algunas lesiones cutáneas.

BIBLIOGRAFÍA

- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. Arch. Virol. 161, 1739–1750. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2794-y
- Csoboz, B., Rasheed, K., Sveinbjørnsson, B., Moens, U., 2020. Merkel cell polyomavirus and non-Merkel cell carcinomas: guilty or circumstantial evidence? Apmis 104–120. https://doi.org/10.1111/apm.13019
- Hampras, S.S., Giuliano, A.R., Lin, H.Y., Fisher, K.J., Abrahamsen, M.E., McKay-Chopin, S., Gheit, T., Tommasino, M., Rollison, D.E., 2015. Natural history of polyomaviruses in men: The HPV infection in Men (HIM) study. J. Infect. Dis. 211, 1437–1446. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu626
- Hashida, Y., Kamioka, M., Tanaka, M., Hosokawa, S., Murakami, M., Nakajima, K., Kikuchi, H., Fujieda, M., Sano, S., Daibata, M., 2016. Ecology of merkel cell polyomavirus in healthy skin among individuals in an asian cohort. J. Infect. Dis. 213, 1708–1716. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw040
- Schowalter, R.M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. a., Moyer, A.L., Buck, C.B., 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe 7, 509–515. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006
- Torres, C., 2020. Evolution and molecular epidemiology of polyomaviruses. Infect. Genet. Evol. 79, 104150. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104150
- Torres, C., Barrios, M.E., Cammarata, R.V., Cisterna, D.M., Estrada, T., Martini Novas, S., Cahn, P., Blanco Fernández, M.D., Mbayed, V.A., 2016. High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. Sci. Total Environ. 542, 192–202. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.047
- Torres, C., Barrios, M.E., Cammarata, R.V., Victoria, M., Fernandez-Cassi, X., Bofill-Mas, S., Colina, R., Blanco Fernández, M.D., Mbayed, V.A., 2018. Phylodynamics of Merkel-cell polyomavirus and human polyomavirus 6: A long-term history with humans. Mol. Phylogenet. Evol. 126, 210–220. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.025

ABSTRACT

Several human polyomaviruses (HPyVs) have been described in the last 15 years, including some with cutaneous tropism such as the Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) -associated with Merkel cell carcinoma-, the trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) and the human polyomaviruses 6 (HPyV6) and 7 (HPyV7).

In this work, frequency of HPyV detection was studied in healthy skin and in biopsy samples of lesions of different severity, including squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC), in population from Argentina.

In healthy skin samples, HPyV detection reached 61.3%, while the co-detection of two HPyVs was observed in 12.0%. MCPyV showed the highest detection frequency (58.7%), followed by HPyV6 (13.3%). HPyV was found in 28.6% of actinic keratosis (AK), 28.6% of SCC and in 18.8% of BCC samples. MCPyV was found in 23.8% of SCC and in 18.8% of BCC samples; and HPyV6, in 14.3% of SCC and in 6.3% of BCC samples. All SCC cases with HPyV+ also presented cutaneous human papillomavirus (HPVc).

Notably, MCPyV was found in five skin lesions that did not show any HPVc detectable, corresponding to three cases of BCC (with one case as MCPyV+/HPyV6+) and two cases of AK.

Therefore, in this work it was shown that the HPyV detection associated with the concomitant detection of HPVc in biopsy samples, suggesting that an interaction between these viruses may take place in tissues and potentially could play a role in the development of disease.

Finally, polyomaviruses with cutaneous tropism are viruses of high prevalence in the Argentinean population and could have an individual or joint role to HPVc in the development of some skin lesions.

CROSSTALK ENTRE PLAQUETAS, B. ABORTUS Y CÉLULAS INMUNES: SU ROL EN LA INFECCIÓN Y LA INMUNOPATOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS HUMANA

Aldana Trotta, Ana María Rodríguez, María Ayelén Milillo, Agustina Serafino, María Victoria Delpino, Guillermo Hernán Giambartolomei, Paula Barrionuevo

Instituto de Medicina Experimental.
CONICET- Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella* que afecta tanto al hombre como a animales domésticos, fauna silvestre y mamíferos marinos. Su presencia en humanos está íntimamente relacionada con el contacto con animales domésticos y/o ganado infectado.

Durante los estadios tempranos de la infección por *Brucella*, el rol principal de la respuesta inmune innata es prevenir la replicación y reducir el número inicial de bacterias, promoviendo el ambiente necesario para una respuesta adaptativa robusta. Las plaquetas, junto con los neutrófilos y los monocitos, son una de las primeras células con las que se encuentran las bacterias al ingresar al organismo.

Las plaquetas han sido ampliamente descriptas como mediadoras de la hemostasia y encargadas de mantener la integridad vascular58. Sin embargo, en los últimos años ha crecido la bibliografía demostrando su relevancia en la modulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa.

A pesar de los avances en el estudio de la interacción de las plaquetas con diversos agentes infecciosos y de la importante participación que se les ha atribuido en la modulación de la respuesta inmune, la interacción entre las plaquetas y las bacterias del género *Brucella* no había sido explorada.

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la presencia de plaquetas favorece la invasión temprana de monocitos/macrófagos por parte de *B. abortus* y que las mismas forman complejos mixtos con los monocitos infectados. Más aún, las plaquetas promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas, y la expresión de moléculas de adhesión y coestimulatorias por parte de los monocitos/macrófagos infectados potenciando la función de dichas células.

Por este motivo, el objetivo general de este proyecto fue estudiar el rol de las plaquetas en la modulación de la capacidad migratoria de monocitos/macrófagos y neutrófilos humanos durante el curso de la infección por *B. abortus*.

RESULTADOS

Las plaquetas infectadas liberan quimioatractantes de monocitos y neutrófilos.

Nuestro primer objetivo fue analizar el rol de las plaquetas en la modulación de la migración de monocitos y neutrófilos. Para ello, realizamos un clásico ensayo de quimiotaxis en placas de *transwell*, utilizando como estímulo quimioatractante medios condicionados provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como podemos observar, el sobrenadante proveniente de plaquetas infectadas promueve la quimiotaxis de células mononucleares de sangre periférica y de neutrófilos (Figura 1).

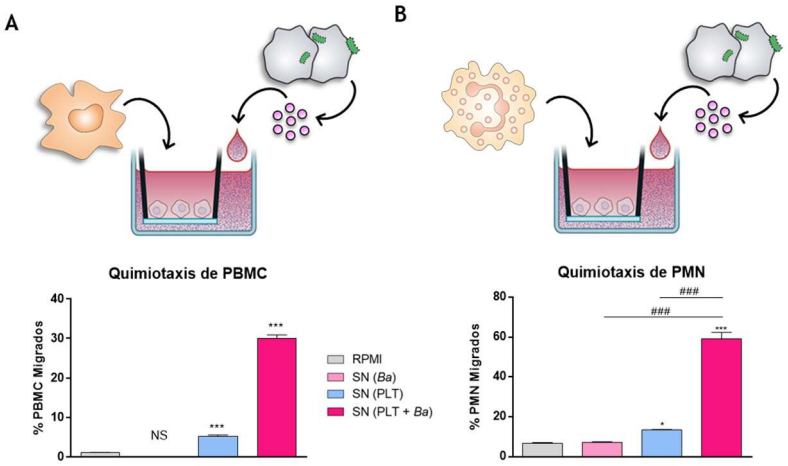


Figura 1. Las plaquetas infectadas liberan quimioatractantes de monocitos y neutrófilos. La información está expresada como porcentaje de células migradas. Las barras representan la media ± SD de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ *vs.* RPMI. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

Las plaquetas promueven la activación del endotelio mediada por *B. abortus*.

El reclutamiento de nuevos leucocitos hacia los sitios de infección requiere que los mismos sean capaces de extravasar hacia los tejidos a través del endotelio activado.

Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran la capacidad de *B. abortus* para activar al endotelio[154], nos preguntamos si las plaquetas son capaces de modular este fenómeno. Para responder esto, células endoteliales provenientes de cultivo primario de cordón umbilical (HUVEC), y de las líneas celulares HMEC y HBMEC fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o ausencia de plaquetas por 24 h. Como medida de la activación endotelial se utilizó la expresión en membrana de CD54.

La presencia de plaquetas durante la infección aumenta significativamente el estado de activación del endotelio, cuantificada como el aumento de la expresión de CD54, en los tres modelos analizados (Figura 2).

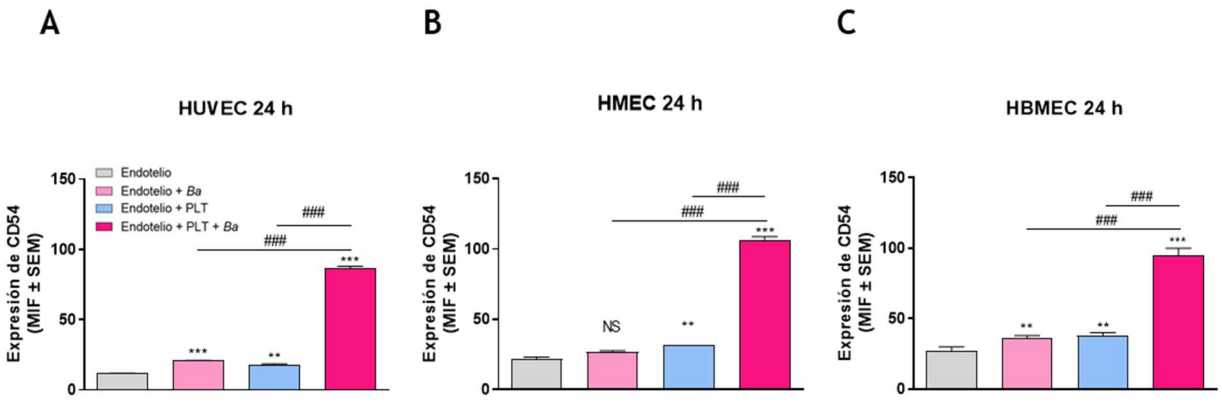


Figura 2. Las plaquetas promueven la activación del endotelio mediada por la infección con *B. abortus*. MIF: media de intensidad de fluorescencia. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. Endotelio: PLT: *Ba* 1:100:100. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* Sin Infectar. ### $P<0.001$. NS: no significativo

Con el objetivo de investigar los mecanismos involucrados en esta modulación, y dilucidar si requería del contacto físico entre las células endoteliales y las plaquetas infectadas, recurrimos a un ensayo de medio condicionados. En este caso, células endoteliales de los tres modelos fueron estimuladas durante 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus* y la activación endotelial fue cuantificada como expresión de CD54 en superficie (Figura 3). Los sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas fueron capaces de activar los tres tipos de células endoteliales demostrando la presencia de factores solubles involucrados en este fenómeno (Figura 3).

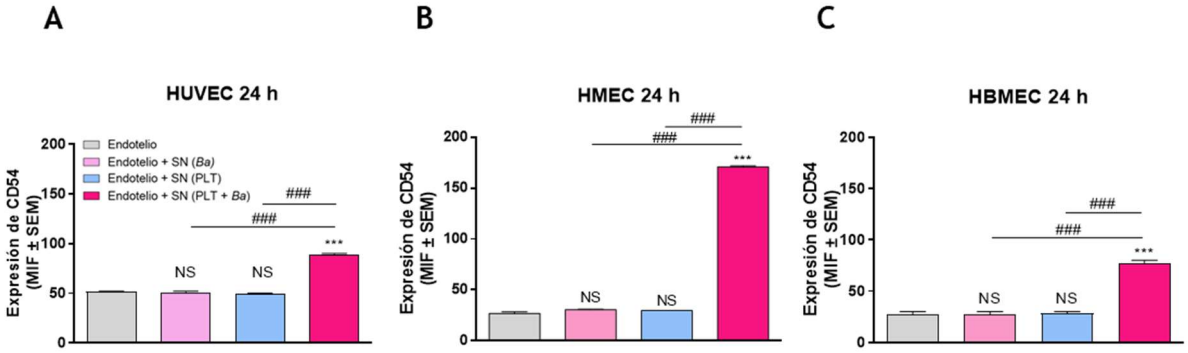


Figura 3. Sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas promueven la activación del endotelio. MIF: media de intensidad de fluorescencia. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

Factores secretados por las plaquetas infectadas activan células HBMEC.

La neurobrucelosis es un trastorno neurodegenerativo causado por la invasión del sistema nervioso central por parte de *Brucella*. Teniendo en cuenta la importancia de barrera hematoencefálica en la homeostasis del sistema nervioso central, a continuación, profundizamos el estudio sobre la activación de células HBMEC inducida por sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas.

Además de la expresión de CD54, el fenotipo activado inducido por el sobrenadante de plaquetas infectadas incluye un aumento significativo de la expresión de CD40 (Figura 4) y de la secreción de IL-6, MCP-1 e IL-8 (Figura 4C-E) en comparación a HBMEC no estimuladas.

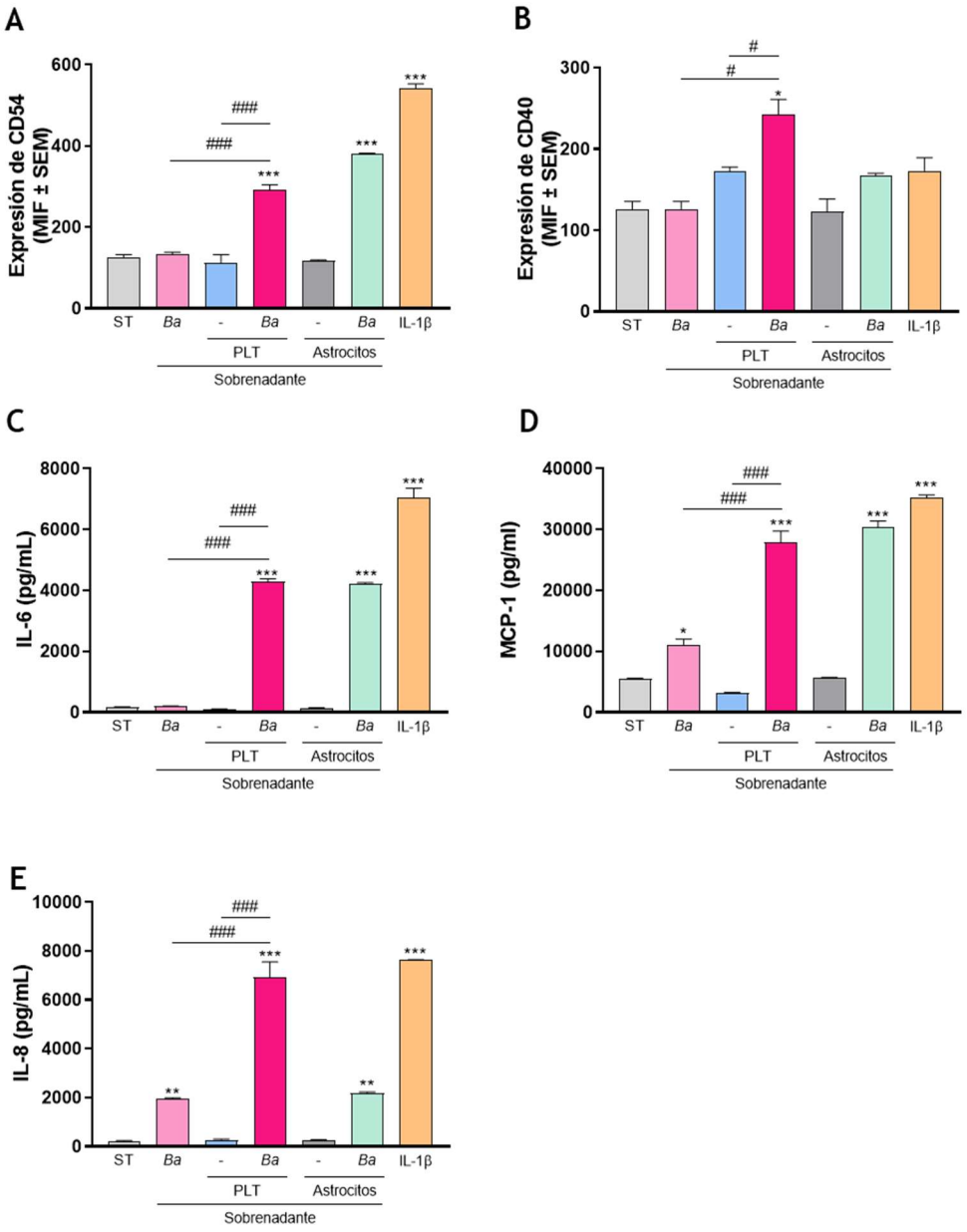


Figura 4. Sobrenadantes de plaquetas infectadas inducen el fenotipo activado de células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * P<0.05; ** P<0.005; *** P<0.001 *vs.* Sin Tratar. $^{\#}$ P<0.05; $^{\#\#}$ P<0.001. NS: no significativo.

Las plaquetas infectadas promueven la transmigración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica.

A continuación, analizamos si la activación del endotelio cerebral inducida por los sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas era suficiente para promover la migración de monocitos y neutrófilos. Para ello, utilizamos un modelo previamente descripto de transmigración a través de la barrera hematoencefálica *in vitro*[156]. Brevemente, este modelo consiste en la formación de monocapas de la línea HBMEC en el pocillo superior de las placas de *transwell* y su estimulación con sobrenadantes provenientes de plaquetas infectadas o no con *B. abortus*. A continuación, células mononucleares de sangre periférica o neutrófilos purificados fueron sembrados en el pocillo superior e incubados por 3 h. Finalmente, se recolectó el medio contenido en el pocillo inferior y se realizó el recuento de las células migradas (Figura 5).

Nuestros resultados indican que el tratamiento del endotelio con el sobrenadante de plaquetas infectadas es suficiente para inducir la transmigración tanto de células mononucleares (Figura 5B) como de neutrófilos (Figura 5C) a través de la barrera.

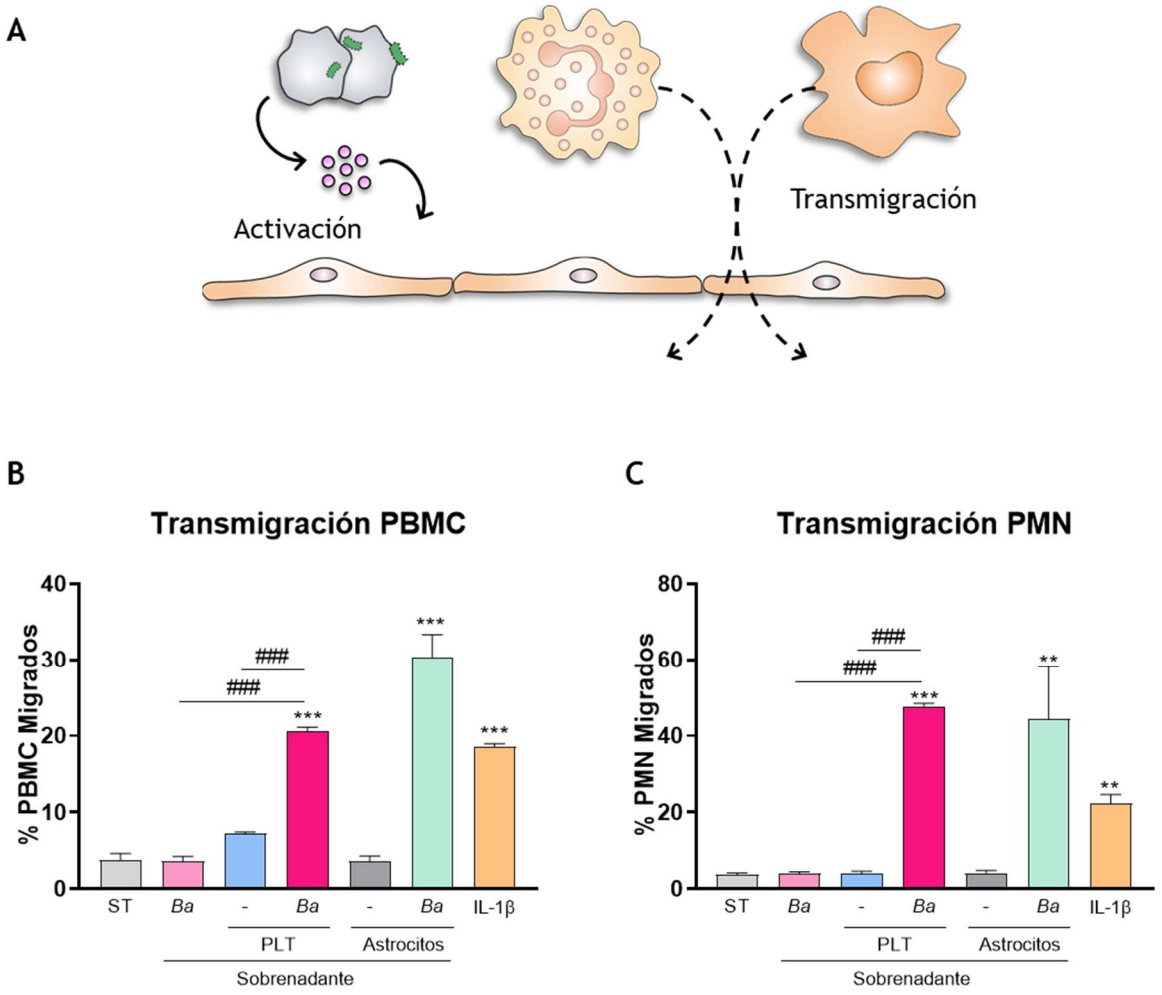


Figura 5. Células HBMEC activadas por plaquetas infectadas con *B. abortus* permiten la transmigración de monocitos y neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica. Las barras representan el porcentaje de células migradas ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. *** $P<0.001$ *vs.* Sin Tratar. ### $P<0.001$. NS: no significativo.

La vía de señalización de Erk1/2 se encuentra involucrada en la transmigración a través de la barrera hematoencefálica.

A continuación, decidimos estudiar el mecanismo molecular involucrado en la activación endotelial y la transmigración celular. Teniendo en cuenta que previamente ha sido demostrada la importancia de la vía de señalización de Erk 1/2 en la activación de células endoteliales de la vasculatura cerebral[160], decidimos investigar su relevancia en nuestro contexto. Para ello, células HBMEC fueron pretratadas con un inhibidor específico de la vía Erk1/2, denominado PD98059. Seguidamente, las células fueron estimuladas por 24 h con sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus*. Como podemos observar, la inhibición farmacológica de Erk1/2 reduce parcialmente la expresión de CD54 inducida por el sobrenadante de plaquetas infectadas (Figura 6A). Más aún, la secreción de citoquinas y quemoquinas por parte de las células HBMEC activadas también se encuentra regulada por esta vía ya que su inhibición con PD98059 disminuye parcialmente la secreción de IL-6, MCP-1 e IL-8 (Figura 6B-D).

El aumento de la expresión de la molécula de adhesión CD54 en la superficie de las células endoteliales es uno de los pasos claves de la migración ya que permite el *rolling* de los leucocitos circulantes sobre el endotelio activado. Dada la importancia fisiológica de este paso, nos preguntamos si la inhibición de la vía de Erk1/2 es suficiente para impedir la transmigración de células a través de la barrera inducida por las plaquetas infectadas. Para esto, nuevamente se realizaron ensayos de *transwell* utilizando el modelo de barrera hematoencefálica previamente descripto. En este caso, la monocapa de células HBMEC fue pretratada con el inhibidor comercial de Erk1/2 (PD98059). Luego, las células HBMEC fueron estimuladas por 24 h con los sobrenadantes provenientes de plaquetas incubadas en presencia o ausencia de *B. abortus* y se realizó el ensayo de transmigración de neutrófilos tal como fue descripto. Nuestros resultados demuestran que la vía de señalización de Erk1/2 no sólo está involucrada en el aumento de la expresión de CD54 en la superficie de las células endoteliales, sino que es necesaria para la correcta transmigración de neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica. (Figura 6E).

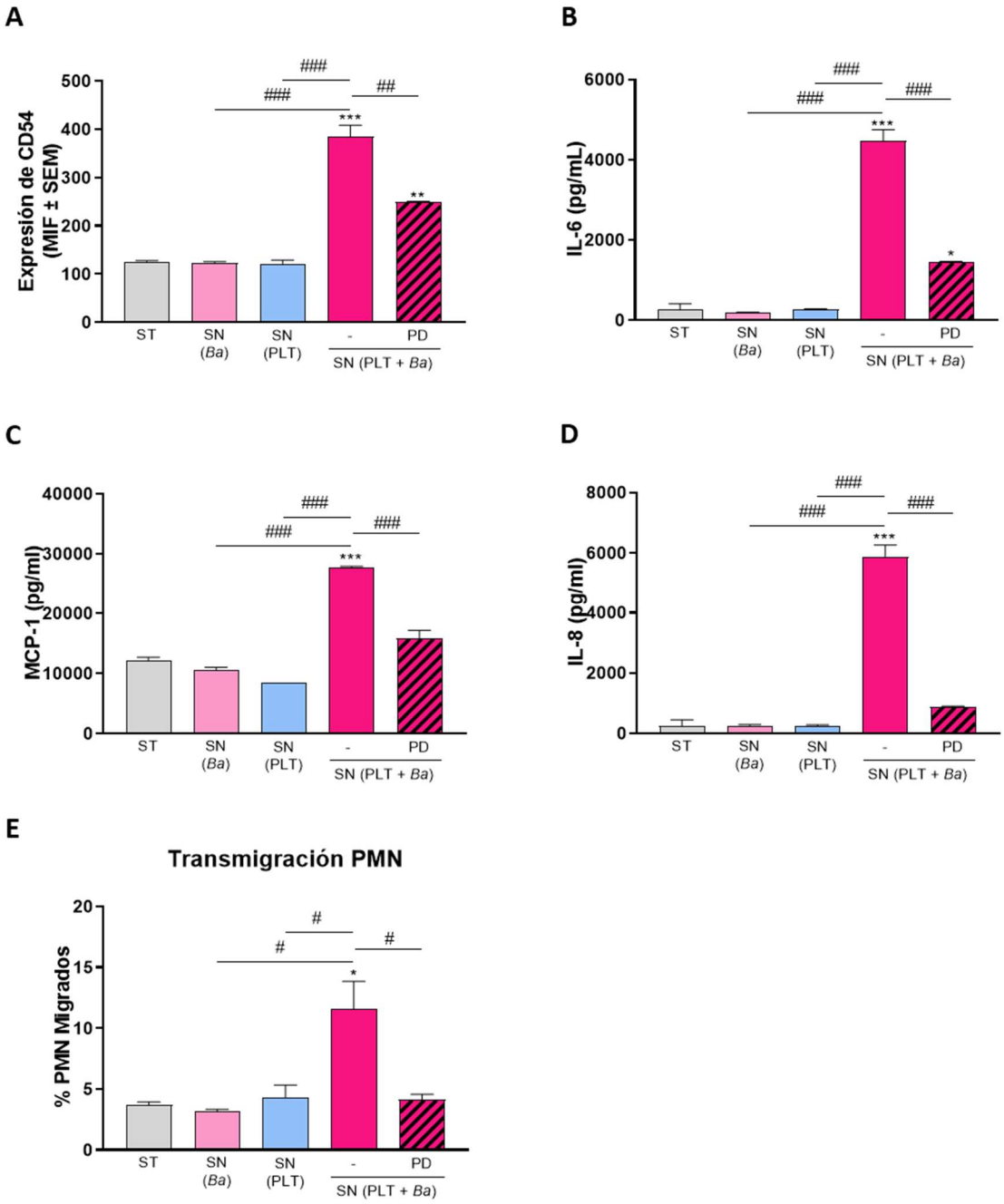


Figura 6. La vía de señalización de Erk1/2 se encuentra involucrada en la transmigración a través de la barrera hematoencefálica. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de un experimento representativo de los tres experimentos independientes realizados. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.001$ *vs.* RPMI. $^{\#}$ $P<0.05$; $^{\#\#}$ $P<0.005$; $^{\#\#\#}$ $P<0.001$.

Estos resultados dieron origen al siguiente trabajo publicado:

Rodríguez, AM*. **Trotta, A***. Melnyczajko, AP. Miraglia, MC. Kim, KS. Delpino, MV. Barrionuevo, P. Giambartolomei, GH. "*Brucella abortus-stimulated platelets activate brain microvascular endothelial cells increasing cell transmigration through Erk1/2*". *Pathogens 9(9): E708,* (2020), doi: 10.3390/pathogens9090708.

*ambas autoras contribuyeron de igual manera a la realización de este trabajo.

SUMMARY

Brucellosis is an infectious disease elicited by bacteria of the genus *Brucella*. Platelets have been extensively described as mediators of hemostasis and as being responsible for maintaining vascular integrity. Nevertheless, they have been recently involved in the modulation of innate and adaptive immune responses. Central nervous system invasion by bacteria of the genus *Brucella* results in an inflammatory disorder called neurobrucellosis. A common feature associated with this pathology is blood–brain barrier (BBB) activation. However, the underlying mechanisms involved in such BBB activation remained unknown. The aim of our study was to investigate the role of platelets in the modulation of monocytes and PMN extravasation in the context of *B. abortus*-mediated infection. Our results showed that supernatants collected from *B. abortus*-infected platelets promoted the chemotaxis of monocytes and neutrophils to the site of infection. Additionally, the presence of platelets during the infection enhanced the activation of HUVEC, HMEC and HBMEC cells, measured as CD54 surface expression and secretion of IL-8 and MCP-1. Moreover, supernatants collected from *B. abortus* infected platelets induced an activated phenotype in HBMEC cells, characterized by the expression of CD40 and the secretion of IL-6, IL-8 and MCP-1, which allow the transmigration of monocytes and neutrophils across the BBB. Finally, our results demonstrate that endothelium treated with supernatants derived from infected platelets allowed the transmigration of both monocytes and PMN cells, in an Erk1/2-dependent manner. These results describe a mechanism whereby *B. abortus*-stimulated platelets induce endothelial cell activation, promoting neutrophils and monocytes to traverse the BBB probably contributing to the inflammatory pathology of neurobrucellosis

BIBLIOGRAFÍA

1. Moral, M. *Enfermedades infecciosas: Brucelosis*. *Guía para el equipo de salud* vol. 12 (Ministerio de Salud de la Nación, 2013)
2. Young, E. J. Human brucellosis. *Rev Infect Dis* 5, 821–842 (1983)
3. Moreno, E. Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* 90, 31–38 (2002)
4. Kahn, F., Hurley, S. & Shannon, O. Platelets promote bacterial dissemination in a mouse model of streptococcal sepsis. *Microbes Infect* 15, 669–676 (2013).
5. Gudbrandsdottir, S., Hasselbalch, H. C. & Nielsen, C. H. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF-alpha secretion by monocytes. *J Immunol* 191, 4059–4067 (2013).
6. Wuescher, L. M., Takashima, A. & Worth, R. G. A novel conditional platelet depletion mouse model reveals the importance of platelets in protection against Staphylococcus aureus bacteremia. *J Thromb Haemost* 13, 303–313 (2015).
7. Busse, R. & Fleming, I. Vascular Endothelium and Blood Flow. in *The Vascular Endothelium II* 43–78 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
8. Li, C. *et al.* Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol* 2012, 384685 (2012).
9. Middleton, J. *et al.* Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385–395 (1997).

10. Trotta, A. *et al.* Platelets Promote Brucella abortus Monocyte Invasion by Establishing Complexes With Monocytes. *Front Immunol* 9, 1000 (2018).
11. Trotta, A. *et al*. "Brucella abortus-infected platelets modulate neutrophils activation". Immunol Cell Biol. 98(9): 743-756, (2020)
12. Zwerdling, A. *et al.* Brucella abortus activates human neutrophils. *Microbes Infect* 11, 689–697 (2009).

EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE TRICHINELLOSIS EN ALBERTI, PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Romina Cynthia Zumpano

Facultad de Ciencias Veterinarias
UBA - SENASA

Argentina posee estatus endémico de trichinellosis. Se trata de una zoonosis que se transmite al hombre por la ingestión de carne o derivados cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, que contengan larvas musculares viables (L1). La aparición de los casos humanos presenta un marcado incremento en la época invernal, asociado al consumo de chacinados, que son elaborados durante esta época del año para aprovechar las bajas temperaturas que favorecen la manipulación de la carne. El cerdo es el animal más comúnmente implicado en brotes, sin embargo, carne proveniente de caballos, jabalíes y otros animales silvestres han tomado relevancia. La trichinellosis es una enfermedad de notificación obligatoria tanto para su presentación en humanos, como en animales. La modalidad de presentación de la trichinellosis en forma de brotes en el humano y en forma de foco en los porcinos, y la falta de tratamiento específico para la infección en la fase quística (encapsulamiento), hacen necesario que los servicios de salud y de sanidad animal tomen medidas para intervenir en los brotes con la mayor urgencia que sea posible. Para un eficiente programa de prevención y control de la enfermedad es fundamental identificar a tiempo casos sospechosos, su presentación y ubicación, así como la detección oportuna y sistemática de las fuentes de infección. También, la veracidad y calidad de los datos, relacionado con los actores del sistema de salud, la comunidad y las acciones ante la enfermedad. En la actualidad no existen estudios que identifiquen los aspectos problemáticos del control y prevención de la enfermedad. Resulta necesario identificar cuál o cuáles son los factores implicados y su peso en el sistema de vigilancia.

El objetivo del presente estudio es describir, analizar y proponer mejoras en este diseño y flujo para el Sistema de Investigación Epidemiológica de la trichinellosis en la Provincia de Buenos Aires, en particular en el Partido de Alberti. Para ello se propuso describir y analizar los flujos de información de los sistemas de vigilancia de trichinellosis, analizar la interacción e integración existente entre los sistemas de vigilancia humana y animal, evaluar la oportunidad, sistematicidad y calidad de los datos de los sistemas de vigilancia humano - animal. En base a esta información se plantean los indicadores cuantitativos y cualitativos de monitoreo y evaluación del programa en sus múltiples dimensiones conociendo la percepción de los actores oficiales en relación al sistema de vigilancia y manejo de información y de otros sectores de la comunidad en relación a la eficiencia del sistema de vigilancia, para finalmente proponer los instrumentos para adecuar el proceso, análisis y toma de decisiones en un sistema integral de Vigilancia de trichinellosis. Se construyeron indicadores de atributos del Sistema de Vigilancia Epidemiológica con la finalidad de realizar un mecanismo de evaluación de dicho sistema, para sus tres

componentes fundamentales: estructura, proceso y resultados, de acuerdo a las normas de Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud en nuestro país.

Para ello, se realizó una descripción y análisis del diseño actual de vigilancia, entrevistando y encuestando a los actores oficiales del sistema en todos sus niveles – el municipio, la provincia y nación -, lo que nos permitió tener un mejor conocimiento sobre sus fortalezas y debilidades. Se realizaron encuestas a los actores sociales -consumidores, expendedores de carne y productores- que están implicados de alguna manera con la presentación de la enfermedad.

En la evaluación general del sistema de vigilancia por parte de los representantes oficiales, se observó que no existiría integración entre ambos sistemas y además, una gran heterogeneidad en las percepciones de cada integrante, tanto en salud humana como en salud animal. Pudo observarse que el sistema de vigilancia epidemiológica animal no cuenta con un procedimiento normado y estandarizado como el de salud humana. Entre los actores sociales encuestados existe un alto porcentaje que escuchó hablar alguna vez de la trichinellosis, similar en el conocimiento de la enfermedad, siendo mucho menor la proporción que saben los síntomas que se presentan en las personas, sobre todo cuando se trata de sintomatología específica. Además, una alta proporción de los encuestados no sabría a dónde dirigirse en el caso de presentar algún síntoma de la enfermedad.

De los resultados de esta investigación se sugiere la implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica integrado entre salud humana - animal, mediante la interrelación en una red de diferentes actores que compartan la información que generan. Un sistema integrado permitiría la instauración de procesos para la adquisición automática, manejo, almacenamiento y análisis de datos epidemiológicos, unificando los diferentes sistemas de información humano – animal a fin de que la comunicación entre las diferentes áreas sea coordinada, rápida y sistemática, favoreciendo la notificación de casos y permitiendo implementar las correspondientes actividades de prevención y control de la enfermedad.

Con la finalidad de revertir la fragmentación detectada en el sistema, se proponen estrategias para prevenir la ocurrencia de la enfermedad. Para lograr elevar la eficiencia global y para reducir costos, se propone desarrollar modelos de análisis de riesgo epidemiológico que permitan reasignar recursos según prioridades del sistema de vigilancia. Los esfuerzos para mejorar los índices redundarían en aumentar la eficiencia operatoria del sistema en su conjunto.

De los estudios realizados, se proponen las siguientes estrategias para llegar a la población en general:

- Difundir conceptos relacionados a los modos de transmisión del parásito y las formas de prevención de la enfermedad.
- Realizar acciones educativas a nivel escolar respecto de los riesgos a la salud provocados por la trichinellosis.
- Generar herramientas pedagógicas y material audiovisual a partir de la integración de los conceptos incorporados.
- Difundir información sobre la prevención de la trichinellosis en la comunidad rural considerando sus hábitos culturales de elaboración y consumo.
- Propiciar buenas prácticas de cría en los productores porcinos.

- Concientizar sobre la importancia del diagnóstico de la carne de cerdo y jabalí previo a su consumo y de la elaboración de chacinados.
- Fomentar la implementación local de un laboratorio para el análisis de muestras por digestión artificial a costos accesibles.

Las principales herramientas de promoción de la salud son el conocimiento de las prácticas saludables y de la enfermedad por parte de todos los ciudadanos.
Sumado a todo lo anterior, también sería de gran importancia realizar campañas para concientizar a la población sobre la responsabilidad que cada consumidor tiene a la hora de prevenir la enfermedad. Es por ello que las campañas educativas de prevención en la comunidad deben enfatizar el consumo de productos de procedencia conocida y la fiscalización del control oficial demostrada en el rótulo del producto, sobre todo en regiones donde la prevalencia de la trichinellosis es alta y la población culturalmente adopta hábitos peligrosos.

El desarrollo continuo e intensivo de los programas de salud comunitaria y la descentralización progresiva de las actividades de salud, requieren con urgencia que las comunidades involucradas participen permanentemente en la identificación de sus propios problemas de salud, en el análisis activo de las nuevas situaciones de salud que van surgiendo, en encontrar las medidas más adecuadas para su control y, por último, en la solución de los problemas.

La comunidad tiene derecho de conocer su situación de salud, los brotes epidémicos que ocurren en un momento dado, su magnitud y letalidad. Los servicios de salud deben ser el elemento ejecutor responsable ante ellos del éxito o fracaso de las medidas propuestas. Si se acepta este criterio, se lograría que la comunidad participe activamente en sus problemas de salud y que además se sienta parte de la resolución de los mismos.

El presente estudio puede ser considerado como modelo de evaluación y análisis de los sistemas de salud para esta y otras enfermedades. Se puede considerar que lo observado y analizado en el partido de Alberti podría ser replicado en otras partes de nuestro país, y que reflejaría la realidad actual en relación al sistema de vigilancia humano - animal y las interacciones con diferentes actores sociales.

Para ello, es necesario continuar realizando investigaciones en otros partidos de la Provincia de Buenos Aires y en otras provincias, en donde la trichinellosis esté presente con alta incidencia de focos y brotes de la enfermedad, con la finalidad de caracterizar la presentación de la misma considerando las actitudes y las percepciones de los actores de salud y de la comunidad en general.

A esto se suma la necesidad de realizar evaluaciones a los sistemas de comunicación social y su evolución, con el fin de desarrollar canales de comunicación directa con todos los grupos sociales relacionados directa e indirectamente con la problemática de esta y otras enfermedades zoonóticas.

Finalmente, revisar y evaluar la legislación vigente ya que la misma genera reacciones negativas en los productores en relación a esta enfermedad. El temor a castigos favorece la idea de ocultar su presencia. Para evitar estos comportamientos negativos sería importante que los organismos de salud revean la legislación, flexibilizando las decisiones en cuanto al control de esta enfermedad y que el Estado se acerque a los productores y a la comunidad de una manera amigable, realizando actividades de extensión y comunicación social. En síntesis, modificar la imagen rígida policial que se mantuvo durante años y que no ha sido efectiva.

A partir de este estudio se propone que se continúen realizando investigaciones en los sistemas de vigilancia epidemiológica de trichinellosis en particular y de las zoonosis en general, a fines de establecer un sistema integrado e interrelacionado que sea eficiente y cumpla con las expectativas de los actores oficiales y también de la sociedad en su conjunto.

BIBLIOGRAFÍA

- Belló M, Becerril-Montekio VM. Sistema de salud de Argentina. Salud Pública Mex; 53 supl 2:S96-S108. 2011.
- Betti A, Cardillo N, Pasqualetti M, Fariña F, Rosa A, Ribicich M. Triquinellosis: Conocimientos y hábitos en poblaciones epidemiológicamente diferentes de la Provincia de Buenos Aires, y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Revista argentina de zoonosis y enfermedades infecciosas emergentes. Volumen IX, Nº 3, ISSN 1851-3638; 9(3): 21-24. 2014.
- Betti A. M, Trinidad J. J, Degregorio O. J. Sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades zoonóticas: evaluación preliminar. Vet. Arg. Vol. XXIII. N°222. 92-101. Abril 2006.
- CDC. Guidelines for Evaluating Surveillance Systems. Supplements MMWR. 37 (S-5); 1-18. 1988. https://www.cdc.gov/MMWr/preview/mmwrhtml/00001769.htm. Fecha de consulta 22/01/2019.
- Ex SAGPyA. Resolución Nº 555/2006. Programa de Control y Erradicación de la Trichinellosis Porcina. 2006.
- Farouk El Allaki, Michel Bigras-Poulina, André Ravel. Conceptual evaluation of population health surveillance programs: Method and example. Preventive Veterinary Medicine 108. 241– 252. 2013.
- González Ochoa E. Diseño y evaluación de sistemas de vigilancia. En: Salud Pública. Colectivo de autores. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2000.
- Klauke DN, Beuhler JW, Thacker SB et al. Guidelines for Evaluations Surveillance Systems. US Department of Health and Human Services; 37 (supl-5):2. MMWR 1988.
- Ley n° 15.465. Declara obligatoria, en todo el territorio de la nación, la notificación de los casos de enfermedades infecciosas. 31 de octubre de 1960.
- Ministerio de Salud. Resolución N° 1715/2007. Normas de vigilancia y control de las enfermedades o eventos de notificación obligatoria. 2007.
- Ministerio de Salud de la Nación. Guía para el fortalecimiento de la Vigilancia de la Salud en el nivel local. Impresión Marzo 2013.
- Ministerio de Salud de la Nación. Recomendaciones para la prevención y el control de la trichinellosis en la República Argentina. En diseño 2016.
- Moliner Batista Ricardo, Ochoa González Edilberto. Evaluación de la vigilancia en la atención primaria de salud: una propuesta metodológica. Rev Cubana Med Trop; 52 (1): 55-65. 2000.

- Ribicich, M. Trichinellosis. Estudio de la infección experimental en cerdos. Importancia económica y sanitaria del diagnóstico temprano. Tesis de Maestría en Salud Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. 1999.
- Ribicich M; Gamble H.R, Bolpe J, Rosa A, Franco A. Trichinellosis in Argentina: an historical review. Vet Parasitol; 132:137-14. 2005.
- SENASA. Resolución N°422/2003. Adecuación a la normativa internacional vigente en cada materia sobre los sistemas de: notificación de enfermedades animales, de vigilancia epidemiológica y seguimiento epidemiológico continuo. 2003.
- SENASA. Resolución N°540/2010. Sistema de registro y notificación de enfermedades denunciables de los animales. 2010.
- SENASA, 2019. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/files/11distribuciondeexistenciasporcinasporcategoriaypartido2017xlsx). Fecha de consulta: 24/01/2019.
- SENASA, Dirección De Control De Gestión Y Programas Especiales. Comunicación personal. 24/01/2019.
- SIEMPRO (Sistema de Información, Monitoreo y Evaluación de Programas Sociales) Banco Mundial, Secretaría de Desarrollo Social, UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura). Gestión Integral de Programas Sociales Orientada a Resultados. 50. 1999.

ABSTRACT

Argentina has endemic status for trichinellosis. It is a zoonoses that is transmitted to man by ingestion of raw or undercooked meat or meat products containing viable muscle larvae (L1). The pig is the most common animal involved in outbreaks, however, meat from horses, wild boars and other wild animals have become relevant. Trichinellosis is a notifiable disease for both humans and animals. The early identification of suspicious cases, their presentation and location, as well as the timely and systematic detection of sources of infection is essential for an efficient disease prevention and control programme. Also, the veracity and quality of the data, related to the actors of the health system, the community and the actions before the disease. The objective of this study is to describe, analyze and propose improvements in the design and data flow of the human-animal epidemiological surveillance system for trichinellosis in a district of the Province of Buenos Aires. For this purpose, a detailed description and study of the current surveillance design was carried out, interviewing and surveying the official actors of the system at all levels, which allowed us to have a better knowledge of its strengths and weaknesses. Surveys were carried out to the social actors (consumers, meat sellers and producers) who are involved in some way with the presentation of the disease. In the general evaluation of the surveillance system by the official representatives, it was observed that there would be no integration between both systems and, in addition, a great heterogeneity in the perceptions of each member, both in human and animal health. It could also be observed that the animal epidemiological surveillance system does not have a standardized procedure such as human health. Among the social actors surveyed, there are a high percentage of them who have ever heard of trichinellosis; this is maintained in a similar way with respect to knowledge of the disease, with a much smaller proportion of those who know the symptoms that occur in people, especially when it comes to

specific symptoms. A high proportion of respondents would not know where to go if they have any symptoms of the disease. This research proposes the implementation of an epidemiological surveillance system integrated between human and animal health, through the interrelationship in a network of different actors that share the information they generate. In order to reverse the fragmentation detected between the system, strategies are proposed to prevent the occurrence of the disease.

FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers