

MARÍA VIRGINIA CROCE (compiladora)

Primer seminario de investigación científica en Ciencias Médicas


EduLP
EDITORIAL DE LA UNLP



**Primer seminario de investigación científica
en Ciencias Médicas**

Primer seminario de investigación científica en Ciencias Médicas

MARÍA VIRGINIA CROCE
(compiladora)

Autores

Judith Celina Bernstein
Juan Pablo Stagnaro
Bárbara Maiztegui
Luis Emilio Flores
Néstor Gustavo Pérez
Susana M. Mosca
Martín Enrique Rabassa
María R. Gonzalez Baro
Pablo Elías Gulayin
Nora Beatriz Molina
Natalia Lausada
Marisa M. Cobos
Mónica Delfina Sparo
Luciano Cermignani
Amalia Luna
Martín Carlos Abba
Marcos Plischuk
María de los Angeles Bacigalupe
Silvana Pujol



Primer Seminario de Investigación Científica en Ciencias Médicas /
Martín Carlos Abba ... [et al.] ; compilado por María Virginia
Croce . - 1a ed . - La Plata : EDULP, 2019.
256 p. ; 21 x 15 cm.

ISBN 978-987-8348-14-8

1. Medicina. I. Abba, Martín Carlos. II. Croce, María Virginia, comp.
CDD 610.72

Primer seminario de investigación científica en Ciencias Médicas
MARÍA VIRGINIA CROCE (*compiladora*)



EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (EDULP)
48 N° 551-599 4° PISO/ LA PLATA B1900AMX / BUENOS AIRES, ARGENTINA
+54 221 44-7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales de las Universidades Nacionales (REUN)

Primera edición, 2019
ISBN 978-987-8348-14-8
Queda hecho el depósito que marca la Ley 11723
© 2019 - Edulp
Impreso en Argentina

*A los estudiantes
de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP*

Prólogo	15
Capítulo 1	17
El fin de la epidemia de VIH/SIDA mediante la implementación de la Estrategia 90-90-90: ¿es posible? <i>Judith Celina Bernstein y Juan Pablo Stagnaro</i>	
Capítulo 2	37
Autofagia de células β . Efecto preventivo de las incretinas. <i>Bárbara Maiztegui y Luis Emilio Flores</i>	
Capítulo 3	55
Señales intracelulares involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica. <i>Néstor Gustavo Pérez</i>	
Capítulo 4	73
Infarto miocárdico producido por isquemia-reperfusión. <i>Susana M. Mosca.</i>	
Capítulo 5	89
Exosomas y neoplasias malignas. <i>Martín Enrique Rabassa</i>	

Capítulo 6	105
Función de GPAT2 en la espermatogénesis y el cáncer.	
<i>María R. Gonzalez Baro</i>	
Capítulo 7	119
Prevención del tabaquismo adolescente. Análisis de un estudio cuasi-experimental antes–después controlado.	
<i>Pablo Elías Gulayin</i>	
Capítulo 8	131
Diarrea infecciosa en pediatría.	
<i>Nora Beatriz Molina</i>	
Capítulo 9	143
Precondicionamiento farmacológico atenuante de la lesión por isquemia-perfusión en trasplante renal experimental. Marcadores de estrés oxidativo-nitrativo.	
<i>Natalia Lausada</i>	
Capítulo 10	161
Estudio epidemiológico de las infecciones por PolyomavirusBK (BKV) en receptores de trasplante renal.	
<i>Marisa. M. Cobos</i>	
Capítulo 11	167
Enterococos de alimentos cárnicos.	
<i>Mónica Delfina Sparo</i>	
Capítulo 12	179
Estudio del cáncer de mama en Polvaredas, Partido de Saladillo, Provincia de Buenos Aires.	
<i>Luciano Cermignani</i>	

Capítulo 13	199
Metástasis cutáneas de cáncer de mama. <i>Amalia Luna</i>	
Capítulo 14	211
Oncogenómica. Progresión del cáncer de mama. <i>Martín Carlos Abba</i>	
Capítulo 15	225
Patologías óseas y envejecimiento. <i>Marcos Plischuk</i>	
Capítulo 16	241
Kinesia paradójal, estigma y Enfermedad de Parkinson. <i>María de los Angeles Bacigalupe y Silvana Pujol</i>	
Autores	251

Agradecimientos

La Prof. Dra. María Virginia Croce expresa su especial agradecimiento al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Médicas, Prof. Dr. Juan Ángel Basualdo Farjat, por su apoyo en la organización de este seminario y al Dr. Martín E. Rabassa por su especial colaboración. Asimismo, agradece a todos los investigadores, docentes y tesisistas que desinteresadamente participaron del seminario comunicando sus líneas de investigación.

El Primer Seminario de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas surgió de la idea de acercar la investigación científica a los estudiantes de grado. Se invitó a presentar sus líneas de investigación a investigadores científicos, docentes y tesistas que realizan su trabajo científico en esta Facultad. La propuesta fue recibida con gran entusiasmo por todos los claustros. Los estudiantes colmaron el Aula Magna y los viernes después de las 17 horas se desarrollaron intensos encuentros.

En este volumen se recogen las exposiciones presentadas, que esbozan en forma clara y generalmente reducida algunos temas de la actividad científica de la Facultad. En conjunto, estos capítulos ofrecen una visión diferente del ámbito educativo clásico, y el resultado de la interacción entre el trabajo de investigadores y la estimulante participación estudiantil con preguntas y debates. Se trata de un texto que resultará útil tanto para los docentes como para futuros investigadores y tesistas debido a que pone de manifiesto la amplitud de los temas y la calidad de las investigaciones.

En este sentido, puede decirse que ésta es una obra completamente original y novedosa y se basa en una actividad educativa caracterizada por un enfoque actualizado e innovador.

Prof. Dra. María Virginia Croce

CAPÍTULO 1

El fin de la epidemia de VIH/SIDA mediante la implementación de la Estrategia 90-90-90: ¿es posible?

Judith Celina Bernstein

Juan Pablo Stagnaro

Introducción y marco teórico

El hecho de poder finalizar la epidemia de infección por VIH/SIDA representa una oportunidad histórica de intentar lograr un mundo más sano, justo y equitativo para las generaciones futuras; para ello es fundamental impulsar programas más amplios e inclusivos en materia de salud y desarrollo y lograr solidaridad mundial en conjunto con la colaboración multisectorial. Aunque harán falta muchas estrategias para acabar definitivamente con la epidemia de SIDA, será imposible terminar con ella sin proporcionar el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a todos aquellos que lo necesiten.¹

En diciembre de 2013, la Junta Coordinadora del *Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA* (ONUSIDA) estableció la meta de alcanzar el fin de la epidemia para el año 2030. El objetivo es reescribir el tratamiento del VIH y considerar un ambicioso objetivo de tratamiento para contribuir al fin de la epidemia de SIDA, la Estrategia 90-90-90 (E90), la cual consiste que en el año 2020:

Que en 2020 el 90% de las personas que viven con el VIH conozcan su diagnóstico de infección por VIH.

2. Que el 90% de los de las personas que viven con VIH reciban terapia antiretroviral.

3. Que en 2020 el 90% de las personas que reciben terapia antiretroviral tengan supresión viral (ONUSIDA, 2014) (OMS, 2013).

El logro de estos objetivos antes del año 2020 permitirá a la comunidad acabar con la epidemia de SIDA en 2030, lo que a su vez generará grandes beneficios económicos y sanitarios. Este triple objetivo permitirá al menos que el 73% de las personas que viven con el VIH (PVVIH) en todo el mundo tenga supresión viral, un número de dos a tres veces mayor que las estimaciones actuales (OMS, 2013).

El tratamiento del VIH es una herramienta fundamental para acabar con la epidemia de SIDA, más no es la única; es imprescindible la implementación de otras estrategias de prevención, entre las que se incluyen: la eliminación de la transmisión materno infantil, las campañas de uso de preservativos, la profilaxis antiretroviral antes de la exposición, la circuncisión masculina voluntaria y bajo supervisión médica en los países prioritarios, los servicios de reducción de daños para personas que se inyectan droga y los programas de prevención centrados en otras poblaciones clave (OMS, 2013) (WHO, 2015).

El TARV para el VIH es una herramienta indispensable en la lucha contra el SIDA, pues evita nuevas infecciones, previene las enfermedades relacionadas con el VIH, evita las muertes relacionadas con el SIDA, y aumenta los beneficios sanitarios y económicos. La esperanza de acabar con la epidemia depende en gran medida de la capacidad de proporcionar el acceso universal al tratamiento para el VIH a todos aquellos que lo necesiten (WHO, 2015)

Las nuevas metas de diagnóstico y tratamiento fueron acordadas durante el “Segundo Foro Latinoamericano y del Caribe sobre el continuo de atención del VIH”, realizado en la Ciudad de Rio de Janeiro en 2015, organizado por ONUSIDA y el *Grupo de Cooperación Técnica Horizontal* (GCTH), entre otros (ONUSIDA, 2015). Este evento

contó con la participación de jefes de programas de VIH de países de América Latina, representantes de la sociedad civil y socios técnicos. Entre los resultados alcanzados en la reunión, se destaca que América Latina y el Caribe articularon como una única región y establecieron un conjunto de metas de prevención y discriminación cero, que reflejan las particularidades de la epidemia y de la respuesta de cada una de las subregiones. Los participantes acordaron también que la prevención combinada sería el abordaje central para cumplir con las metas preventivas propuestas por ONUSIDA.

Según el Boletín sobre el VIH, SIDA e ITS, se estima que 110.000 personas viven con VIH en nuestro país, de las cuales el 30% desconoce su condición. Anualmente se diagnostican alrededor de 5.000 personas y 1.400 personas fallecen por SIDA en ese mismo lapso. Aproximadamente 52.000 personas se encuentran recibiendo TARV, el 69% de las cuales lo hace a través del sistema público de salud.

Durante la “IX Conferencia de la Sociedad Internacional del SIDA” realizada en la ciudad de París en 2017, la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) ha presentado sus directrices para el manejo de la enfermedad por el VIH avanzada y para el inicio rápido de la terapia antirretroviral. De acuerdo con esta guía, a cualquier persona diagnosticada de infección por el VIH se le debería ofrecer la opción de iniciar el tratamiento antirretroviral en el plazo de siete días tras el diagnóstico y cualquier paciente debería tener la opción de iniciar la terapia el mismo día del diagnóstico (OMS, 2017).

Un equipo de expertos en modelización sanitaria ha proyectado las consecuencias de E90 en materia económica y sanitaria. El modelo reveló que alcanzar estos ambiciosos objetivos, incluida la rápida ampliación del tratamiento antes de 2020, reduciría el número anual de nuevas infecciones por VIH en casi un 90% y el número de muertes relacionadas con el SIDA disminuiría en un 80%, lo que permitiría poner fin a la epidemia mundial de SIDA antes de 2030. Será preciso implementar un plan de acción sin precedentes que amplíe a la mayor brevedad el tratamiento antirretroviral temprano; se necesitará combi-

nar la voluntad política, las directrices normativas basadas en pruebas, la generación continuada de pruebas críticas para la actuación y los recursos financieros suficientes para alcanzar el objetivo 90-90-90 y mantener de por vida el tratamiento del VIH para decenas de millones de personas en todo el mundo. Para ello será necesario, no solo una nueva mentalidad, sino también nuevos modos de funcionamiento globales para constituir una base sólida que impulse el esfuerzo mundial que permita acabar así con la epidemia de aquí a 2030.

El municipio de Florencio Varela está situado en el segundo cordón del conurbano bonaerense. En el último censo se constató que 426.005 personas vivían en el territorio según el Censo Nacional de Hogares y Viviendas realizado en 2010. Se calcula que 1704 personas que viven con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (PVVIH) en este municipio, usando como medida la seroprevalencia encontrada en los testeos de efectores públicos de salud, tanto municipal como provincial (que variaron entre 0,70 a 1,74% entre los años 2009-2016) y las estimaciones realizadas por el Ministerio de Salud de la Nación (0,4% de prevalencia en la población joven).

En el año 2015 se presentó un trabajo en el “XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología”, realizado conjuntamente entre los dos efectores de salud del subsector público de Florencio Varela –el Hospital Zonal General de Agudos “Mi Pueblo” y los Centros de Atención Primaria de la Salud Municipales–, cuyos resultados fueron alarmantes: de 158 PVVIH diagnosticados entre los años 2010 y 2014 el 30,3% de los pacientes llegan a la consulta con un recuento menor de 200 linfocitos TCD4/mL (CD4), el 52,5% con menos de 350 CD4 y el 39,25% de los pacientes tiene SIDA al momento del diagnóstico. Implica que han accedido tardíamente a la consulta médica (SADI, 2015). El impacto es aún peor si se evalúa a la mujer embarazada, ya que en el 69,2% de los diagnósticos se hacen durante el tercer trimestre, a pesar de la obligatoriedad del ofrecimiento del testeo a partir del año 2001 (SADI, 2015).

La E90 que plantea ONUSIDA para el año 2020 actualmente está lejos de poder realizarse en nuestra comunidad. Es por ello que nos hemos preguntado: ¿Se puede aumentar el porcentaje de PVVIH con CV indetectable implementando una serie de medidas basadas en la estrategia 90-90-90 (SM90) en un municipio del conurbano bonaerense? Se plantea entonces la hipótesis que la implementación de SM90 en un municipio del conurbano bonaerense aumentaría el porcentaje de PVVIH con carga viral indetectable (AIDS, 2012).

Hipótesis

La implementación de una serie de medidas orientadas en la E90 en Florencio Varela aumentaría el porcentaje de PVVIH/SIDA con carga viral (CV) indetectable.

Objetivos

Objetivo General

1. Determinar la efectividad de una serie de medidas orientadas en la E90 para aumentar el porcentaje de pacientes con carga viral indetectable en el municipio de Florencio Varela.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a la población con VIH/SIDA que reside en el municipio de Florencio Varela.
2. Llegar a la detección temprana de la infección por el VIH.
3. Incrementar el número de pruebas rápidas para la detección de la infección por VIH.
4. Disminuir el porcentaje de personas que llegan a la consulta en etapa del SIDA.

5. Realizar el testeo a las parejas sexuales de las PVVIH, bajo consentimiento informado.
6. Incrementar el número de PVVIH que reciben TARV.
7. Aumentar el porcentaje de personas en seguimiento médico.
8. Disminuir el número de personas que se desvinculan del tratamiento.
9. Aumentar el porcentaje de pacientes con supresión de la viremia a niveles indetectables.

Materiales/Pacientes y Métodos

Descripción del ámbito de estudio

El estudio fue realizado en el municipio de Florencio Varela, situado en el segundo cordón del conurbano bonaerense, con una población de 426.005 personas. La atención ambulatoria de las PVVIH en el sector público se realiza: en el subsector municipal, en los consultorios externos de los Centros de Atención Primaria de Salud (CAPS) “Padre Gino” y “Villa Vatteone”, donde además funciona geográficamente la Secretaría de Salud y el Programa Municipal de VIH, Infecciones de transmisión sexual (ITS) y hepatitis virales; en el subsector provincial la atención se realiza en la Unidad de Infectología del Hospital Zonal General de Agudos “Mi Pueblo” (HMP).

Tipo de estudio y diseño

Se realizó un estudio de intervención, de diseño prospectivo, con aplicación de una SM90 con tres fases: pre intervención, intervención y de resultados.

La fase de pre intervención consistió en recabar información para la realización del análisis de situación; en cada uno de los centros se recolectó el número total de PVVIH diagnosticados desde el año 2012 hasta el 2017, estadio clínico al momento del diagnóstico, re-

cuento de linfocitos TCD4 (CD4) al momento del diagnóstico, situación respecto del seguimiento a diciembre de 2017, retiro de la medicación ARV en los últimos dos meses de 2017 y CV indetectable en el último año.

La fase de intervención consistió en aplicar las SM90:

1. Estrategia diagnóstica: Aumentar el número de realización de los test rápidos; para lograrlos se planteó aumentar la frecuencia de oferta (con más días para realizarlo) y aumentar los lugares para realizarlo

2. Estrategia de indicación, administración y dispense de las drogas antirretrovirales: aumentar el porcentaje de PVVIH con accesibilidad a los ARV; para lograrlo se realizó la indicación de TARV a todo paciente luego de la primera o segunda visita con el médico infectólogo, luego de la realización de una evaluación clínica inicial y realización de estudios complementarios de inicio; se aumentó la frecuencia donde la PVVIH pueda retirar el TARV; se realizó la búsqueda y rastreo de las PVVIH que no hayan retirado el TARV en los últimos dos meses a través de llamados telefónicos o contacto con las trabajadoras sociales o promotoras de salud de los CAPS cercanos al domicilio registrado del paciente; se realizó el control virológico temprano para aumentar el porcentaje de PVVIH con CV indetectable, para lo cual se llevó a cabo en forma sistemática la extracción de sangre para CV en personas *naive* con reciente inicio de TARV y en las personas en seguimiento.

La tercera parte del estudio consistió en la evaluación de la efectividad de la SM90. Se recolectó información tanto de los nuevos diagnósticos como de los pacientes en seguimiento: número, situación clínica y recuento de CD4. Se evaluó el porcentaje de pacientes con CV indetectable al finalizar el estudio y el porcentaje de pacientes que retiraron la medicación en los últimos dos meses del estudio. Se compararon los valores con los mismos indicadores pre intervención.

Población objetivo

- a. Universo o población objetivo: PVVIH atendidas en el HMP y en el Programa Municipal de VIH, ITS y Hepatitis Virales.
- b. Unidad de análisis, criterios de inclusión y de exclusión.
 - b.1. Unidad de análisis: PVVIH atendidas en el HMP y en el Programa Municipal de VIH, ITS, y Hepatitis Virales entre 2012 y 2019.
 - b.2. Criterios de inclusión:
 - PVVIH mayores o iguales de 15 años atendidas en el HMP y en el Programa Municipal de VIH, ITS, y Hepatitis Virales entre 2012 y 2019.
 - b.3. Criterios de exclusión:
 - PVVIH menores de 15 años
 - PVVIH que se atienden circunstancialmente en el HMP o Programa Municipal de VIH, ITS y Hepatitis Virales, pero tienen pedida la medicación o su médico de cabecera en otra jurisdicción.
- c. Selección y tamaño de la muestra: la población accesible y la muestra corresponden en este caso a las unidades de análisis, ya que se seleccionaron a todos los pacientes atendidos entre el 2012 y 2019 que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión. No se calculó el tamaño muestral porque se trabajó con el universo.
- d. Análisis de sesgos: Se esperó una pérdida de datos no superior al 5% y en el caso de información perdida automáticamente la variable adoptó el valor del peor resultado posible.

Selección de técnica e instrumento de recolección de datos

Para la recolección de los datos pre y post intervención se utilizaron las historias clínicas confeccionadas para la atención de los pacientes.

Se creó una base de datos en *Google forms* para poder recabar la información. Luego, esa base de datos en formato de hoja de cálculo se exportó al programa SPSS v.20.0 para su análisis posterior.

Plan de análisis de los datos

Se resumieron las variables dicotómicas en porcentajes, se compararon las medias entre los datos recabados en el análisis de situación y los recabados post intervención. Se estableció el *Odds Ratio* (OR) con determinaciones del Intervalo de confianza del 95% (IC95) y regresión logística con determinación de significancia estadística menor al 0,05 ($p < 0,05$).

Procedimientos para garantizar los aspectos éticos de la investigación

Se utilizó un formulario de Consentimiento Informado, versión 1.0/2017-13/11/2017 el cual incluyó la información para el participante.

Resultados

Se atendieron un total 631 pacientes en los 5 centros participantes. 324/631 (51,3%) pacientes cumplieron con criterios de inclusión (diagnóstico entre 2012 y 2017); 111/324 (35,2%) con criterios de exclusión: 16 pacientes fallecidos (4,9%), 4 fallecidos durante el período del estudio; 12 pacientes menores de 15 años de edad (3,7%), todos con infección por transmisión vertical; 61 pacientes tenían obra social (18,7%); 22 (6,7%) pacientes se atendieron por lo menos una vez en Florencio Varela (subsector público) y actualmente se atienden en otros hospitales o están judicializados (en Servicio Penitenciario Bonaerense o Nacional o en dependencias policiales).

Nuestro $n=213$. El cálculo del tamaño fue de 200 pacientes en Argentina, según consta en el registro RENIS bajo el número IS002050. 167 pacientes se diagnosticaron entre el 01/12/ 2012 y el 31/12/2017 y 46 pacientes (21,6%) fueron diagnosticados entre el 01/01/2018 y el 30/04//2019. Desde el 01/05/2018 al 30/04/2019 se diagnosticaron 36 pacientes.

El 43,7% (93/213) son hombres y el 56,3% (120/213) mujeres. Un solo hombre con identidad de género Trans. El 93,9% (200/213) reside en Florencio Varela, cuya distribución barrial se expone en la tabla 1; el 2,3% (5/213) en Quilmes, el 1,9% (4/213) en Berazategui, 1,4% (3/213) en Almirante Brown y 0,5% (1/213) en Temperley.

La edad promedio al diagnóstico de la enfermedad es 34,63 (rango 11-63), mediana: 33,45 y desvío estándar (DS): 11,12. La edad promedio al momento del estudio: 37,23 (17-65)

El 61% (108/177) de las PVVIH tienen trabajo (formal o informal).

La CV inicial promedio es 147.224 copias/mL y la mediana: 28.311 copias/mL, 11 pacientes tuvieron su primera determinación de CV luego de haber iniciado el tratamiento, por lo que se excluyeron del cálculo.

El grado de inmunodeficiencia asociada al VIH estudiada, según el recuento de CD₄ es severa en 58/192 pacientes (30,2%), avanzada en 51/192 (26,6%), leve 30/192 (15,6%) y no significativa en 53/192 (27,6%); no fue evaluada en 21 pacientes. El 36,6% (75/205) de las PVVIH presentan SIDA (8 datos de pacientes, perdidos).

38,3% (70/183) de las PPVIH han tenido en algún momento otras infecciones de transmisión sexual (ITS).

El 20,5% (35/171) de las PVVIH padecen de adicciones activas.

Las principales coinfecciones asociadas al VIH son: hepatitis B en el 4,8% (9/187), hepatitis C en el 3,2% (6/186) y tuberculosis (TB) clínica o latente en el 16,4% (23/140).

Objetivo general

Se logró aumentar el porcentaje de personas con carga viral indetectable en un 10%. El valor pre intervención fue de 59,37% (95/160) y el de post intervención fue 69,82% (118/169), con una $p=0,05$ (estadísticamente significativo); OR: 0,63; IC 95: 0,4-0,99

Objetivo 1: Detección temprana de la infección por VIH

Al comparar las proporciones de diagnósticos tempranos (definido como recuento de CD4 >350) en la etapa pre intervención fue de 58,4% (90/154) mientras que en la etapa post intervención fue de 50% (19/38); $\chi^2=0,88$; $p=0,347$ (no significativa) OR: 1,4 IC95: 0,69-2,86.

El promedio de CD4 pre intervención: 368,38 (2-1816), DS: 24,86. Y el promedio de CD4 post intervención: 398,66 (20-1310), DS: 43.

Objetivo 2: Incrementar el número de pruebas rápidas

En el período 2018-2019 se implementó el testeo en 4 nuevos “Centros de Testeo para VIH” en los CAPS Carolina II, Santo Tomás, El Parque, Padre Gino, Villa Argentina y Malvinas y se reinició el testeo en los centros Santo Tomás y El Parque, sumándose a los 3 Centros ya existentes: Don José, Hudson y Villa Vatteone y el Centro de Testeo del Hospital Mi Pue. Se realizó la correspondiente capacitación del equipo de salud interviniente. Se realizaron en total 27054 determinaciones diagnósticas para VIH, siendo reactivas un total de 130 de ellas (0,48%). Durante el año 2018 se hicieron 1486 TR y 19221 determinaciones de ELISA VIH de 4ta generación; en el año 2019 (hasta el mes de abril) se hicieron 442 TR y 5905 ELISA VIH. Las determinaciones siguen realizándose en su mayor medida sobre el diagnóstico de ELISA VIH de 4ta generación, a partir de la consulta médica realizada en los CAPS y HMP.

Objetivo 3: Disminuir la llegada a la consulta en etapa de SIDA

El porcentaje de personas a las que se les realizaba el diagnóstico con enfermedad avanzada (SIDA) pre intervención, era del 40,1% (65/162). Post intervención, el porcentaje de personas con SIDA al momento del diagnóstico fue 25,6% (11/43). $\chi^2: 3,08$; $p= 0,07$ (no significativa), OR: 1,94 IC95: 0,91-4,14.

Objetivo 4: Incrementar el testeo de las parejas sexuales

Se realizó el testeo de las parejas sexuales de las PVVIH en seguimiento en aquellos casos de no conocer su situación ante la infección

por VIH. En la etapa pre intervención se testearon el 62% de las parejas de los pacientes (67/108); en la etapa post intervención se testearon el 57,9% (22/38), χ^2 : 0,2 $p=0,65$ (no significativo).

Objetivo 5: Incrementar el número de PVVIH que reciben TARV

En lo que respecta al inicio del TARV, se observó diferencia a favor de la pre intervención: 95,8% (161/168), versus 90,7% (39/43) en la post intervención; χ^2 : 1,82, $p=0,17$ (no significativa), OR: 2,35 IC95: 0,65-8,46.

Objetivos 6 y 7: Aumentar el porcentaje de personas en seguimiento médico y disminuir el número de personas que se desvinculan del tratamiento.

Se consolidaron los resultados de ambos objetivos en uno mismo, porque el objetivo 7 (desvinculación) es el inverso del 6 (vinculación); se evaluó vinculación. En la etapa de pre intervención el 83,3% (140/167) de PVVIH estaban vinculadas, aumentando a 88,7% (189/213) durante la post intervención, $p=0,17$ (no significativo); OR: 0,65; IC95: 0,36-1,19

Objetivo 8: Aumentar el porcentaje de PPVIH con supresión de la viremia a niveles indetectables

Se logró incrementar a aproximadamente un 20% el número de PVVIH que lograron tener niveles indetectables de viremia o control temprano de la viremia, entre la pre intervención (59,73%; $n=95/65$) y post intervención (80,47%; $n=136/33$) $p<0,0001$; OR=0,35; IC95: 0,25-0,58 (estadísticamente significativo).

Discusión

En este trabajo se han estudiado características socio-epidemiológicas, clínicas, e inmunológicas para conocer el perfil de los individuos evaluados. Se trata de una población de adultos jóvenes, con una edad promedio de 34 años al momento del diagnóstico de la enfermedad y predominio de mujeres. Los pacientes residen mayoritariamente en el partido de Florencio Varela y un pequeño número en municipios cercanos: Quilmes, Berazategui, Almirante Brown y Temperley. Solo el 61% de las PVVIH tienen trabajo formal o informal, por lo que en su mayoría los pacientes dependen del sistema de salud estatal; el suministro de atención médica, TARV y realización de estudios de laboratorio y otros exámenes complementarios para el control y seguimiento clínico de su enfermedad se realiza en el HMP, CAPS municipales y Programa Nacional de SIDA.

La tasa de prevalencia de infección por VIH en la población de pacientes es de 0,4%, similar a la tasa de prevalencia nacional.⁶ Más de la mitad de la población estudiada se diagnostica cuando se presenta la inmunodeficiencia moderada o grave. Este hecho demuestra que el diagnóstico se hace tardíamente, en pacientes que presentan intenso deterioro psico-orgánico e inmunológico, lo que deriva en numerosos casos a un inicio tardío del TARV y la quimioprofilaxis contra las infecciones oportunistas y a la presentación de secuelas permanentes que impactan profundamente en la calidad de vida de los pacientes, en la salud del individuo y con el riesgo de muerte y secuelas que conlleva. Un estudio realizado por Bernstein en la misma población en el año 2005, arrojó resultados similares, lo que indica que este parámetro requiere de medidas sostenidas en el tiempo para poder ser modificado (Tesis Doctoral, 2010: 130).

El 38,3% de los individuos con VIH estudiados, han tenido otras ITS en algún momento; las relaciones sexuales son la práctica de riesgo de mayor prevalencia para la transmisión de la infección por VIH y a dónde deben dirigirse los mayores esfuerzos para la prevención.

Para el logro de este objetivo deben implementarse programas de educación sexual y para la salud a través del proceso educativo, en el nivel de la escuela primaria y especialmente en la secundaria, pero también mediante el trabajo comunitario en organizaciones barriales, sociedades de fomento y centros de atención primaria de la salud, de forma tal que toda la población pueda acceder a la información (Revista Cubana de Salud Pública; 2017: 166-79).

Según el Manual de Trastornos Adictivos, un 20,5% de la población padece de adicciones activas; se conoce que entre aquellos que presentan un trastorno por uso de sustancias hay una alta prevalencia de comorbilidad psiquiátrica, que conlleva dificultades inherentes de evaluación y tratamiento, así como problemas en la adherencia al TARV; la adherencia de los pacientes al tratamiento es una de las principales dificultades que se presentan actualmente y que se presenta en todos los lugares del mundo, ya que la adherencia determina las posibilidades futuras de disponibilidad de esquemas terapéuticos útiles para ese sujeto y por ende su supervivencia. Mirando un poco más allá de esta cuestión, se deduce que también determinará la futura diseminación en la comunidad de virus resistentes a las drogas antiretrovirales disponibles en uso. Las principales coinfecciones asociadas al VIH son la TB clínica o latente, la hepatitis B y la hepatitis C. Según la Organización Panamericana de la Salud, la infección por VIH/SIDA constituye una de las causas del incremento de la incidencia de TB en la Argentina en los últimos años, por lo que representa uno de los principales problemas de salud en pacientes infectados por VIH, con un gran impacto en la calidad de vida; la incidencia de TB en personas con SIDA es casi 500 veces mayor que la incidencia en la población general.²⁰ Según el Boletín, la hepatitis B se relaciona con la principal vía de contagio del VIH en nuestra población que es la sexual y demuestra a su vez la inadmisibles falta de accesibilidad de nuestros pacientes a la vacuna que previene el contagio de esta enfermedad. La coinfección con el virus de la hepatitis C es actualmente

una de las principales causas de morbimortalidad y enfermedad hepática en individuos con VIH/SIDA que no acceden al tratamiento.⁶

Mediante la implementación de SM90, se logró el objetivo general de este estudio: aumentar el porcentaje de personas con carga viral indetectable en Florencio Varela, en un 10 %. Esto demuestra la eficacia del TARV y de la intervención realizada y explica el resultado obtenido en función de una de las principales limitaciones, que fue el tiempo durante el que transcurrió el estudio, solo 12 meses. La sostenibilidad a largo plazo de estas medidas, tal como lo plantea la SM90, lograría mejores resultados. Otra dificultad hallada fue la georreferenciación de los pacientes, por cambios no registrados de domicilio y de números telefónicos que dificultaron el proceso de revinculación de los pacientes con el sistema de salud, para lo cual sería necesario ampliar la oferta de acciones en prevención e implementar y consolidar un modelo de cuidado integral mediante la descentralización del cuidado de la salud, construido en los territorios y con la comunidad. Además, el escaso recurso humano capacitado disponible limitó la velocidad en la realización del estudio.

En cuanto a la detección temprana de la infección por VIH, no hubo diferencias en los valores obtenidos pre y post intervención; como se comentó anteriormente, los pacientes llegan tardíamente al diagnóstico, por múltiples causas que generan el retraso en el diagnóstico: falta de educación, temor al diagnóstico, dificultad en el acceso a los servicios de salud, autoestigmatización.

Si bien se logró incrementar el número de pruebas rápidas de detección para VIH, el mayor número de determinaciones para VIH continúa realizándose en el subsector hospitalario, siendo necesario aumentar el testeo en los “Centros de testeo” de los CAPS. Se observa que existe una insuficiente difusión de la utilidad del test rápido, no solo a la población en general sino también al equipo de salud. La utilización de pruebas rápidas facilita el diagnóstico en lugares con accesibilidad disminuida por la distancia, reduce las dificultades en los circuitos y en los laboratorios y favorece el trabajo en las poblaciones más vulnera-

bles al virus. En el marco del proceso de asesoramiento, estas pruebas deben ser realizadas por personas especialmente capacitadas.

La llegada a la consulta del individuo en etapa de SIDA continúa siendo un desafío. En la post intervención, fue solo de un 15% menos; esta diferencia no fue estadísticamente significativa, probablemente por el escaso tamaño muestral del período post intervención.

Se considera una medida de fundamental importancia para el control de la epidemia el incremento en el testeo de las parejas sexuales; los resultados obtenidos en este estudio demuestran que no se logró aumentar el número de testeos en las parejas de las PVVIH, siendo los resultados obtenidos estadísticamente no significativos.

La implementación del TARV no puede realizarse en forma sistemática o compulsiva; requiere de un trabajo previo del paciente con todo el equipo de salud, ya que es fundamental fortalecer la adherencia al mismo, factor de gran importancia para sostener la indetectabilidad de la CV en el tiempo. Uno de los factores que dificulta la adherencia al tratamiento a largo plazo es la intrusividad del mismo, entendiéndose por intrusividad aquellas características del régimen terapéutico que interfieren en la vida cotidiana de la persona, impidiendo el desarrollo habitual de la misma. Esto sucede cuando el paciente debe tomar su medicación en horario de trabajo o cuando se presentan efectos adversos durante el mismo (diarrea, somnolencia), o simplemente cuando está fuera de su hogar. La adherencia al tratamiento también supone que deben resolverse cuestiones paralelas que usualmente se presentan en los pacientes como la depresión, la ansiedad, el consumo y abuso de drogas.

A pesar del escaso período en que se desarrolló este estudio, se logró incrementar la vinculación de los pacientes con el sistema de salud, siendo de primordial importancia sostener esta tendencia.

Se logró aumentar en 20% el número de PVVIH que lograron tener niveles indetectables de viremia entre la pre y la post intervención. Se consideró, además de la definición de CV indetectable, el concepto de “control temprano de la carga viral” (disminución de por

lo menos un logaritmo en el valor de la CV en un mes de tratamiento efectivo). Se decidió utilizar este concepto debido a que la duración del estudio, de tan solo 12 meses, ha dificultado establecer contacto con las PVVIH, controlarlas por medio de exámenes de laboratorio e indicar o reiniciar el TARV buscando la indetectabilidad, situación que se daría (por definición teórica) a los seis meses de iniciado el TARV. Ambas categorías se evaluaron con el nombre de “CV indetectable”.

La implementación de estrategias basadas en la SM90 pueden realizarse y su efectividad depende de factores básicos, como la entrega de medicación antiretroviral en tiempo y forma por el Programa Nacional de VIH/SIDA, turnos disponibles para estudios de control y seguimiento, del acceso del paciente al sistema de salud, de mejorar el sistema de georreferenciación para facilitar la localización de los pacientes y de un buen accionar del equipo transdisciplinario de salud.

Conclusiones

- La SM90, puede ser implementada en nuestro país, pudiendo reducirse el número anual de nuevas infecciones por VIH y el número de muertes relacionadas con el SIDA.
- Para obtener los resultados esperados, debe lograrse la sostenibilidad de su implementación a largo plazo.
- Es necesario implementar una mayor inversión en testeo, personal capacitado y promoción de la salud, con políticas efectivas y sustentables.
- Es importante trabajar la vinculación, fortaleciendo la relación médico-paciente para generar adherencia al TARV, siendo fundamental el abordaje transdisciplinario.

Bibliografía

1. ONUSIDA. Ginebra: ONUSIDA; 2014. 90-90-90 un ambicioso objetivo de tratamiento para contribuir al fin de la epidemia de SIDA.
2. OMS. Ginebra: OMS; 2013. Directrices consolidadas sobre el uso de medicamentos antirretrovirales para el tratamiento y la prevención de la infección por VIH.
3. World Health Organization. Geneva: WHO; 2015. Consolidated guidelines on HIV testing services.
4. WHO. Geneva: WHO; 2015. Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV.
5. Grupo de Cooperación Técnica Horizontal (GCTH) ONUSIDA. Segundo Foro Latinoamericano y del Caribe sobre el continuo de atención del VIH. Rio de Janeiro, 2015.
6. Dirección de Sida, ETS, Hepatitis y TBC, Secretaría de Gobierno de Salud, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la República Argentina. Boletín sobre el VIH, SIDA e ITS en la Argentina. N° 35, año XXI. Diciembre 2018.
7. OMS, Guidelines for managing advanced HIV disease and rapid initiation of antiretroviral therapy, 2017.
8. Grinsztejn B, Hosseinipour MC, Ribaud HJ, et al. Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 HPTN 052 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*, 2014; 14(4):269-80.
9. Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG, et al. Effect of Early versus Deferred Antiretroviral Therapy for HIV on Survival. *N Engl J Med*, 2009; 360(18): 1815-26.
10. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina. Censo Nacional de Hogares y Viviendas 2010.
11. Stagnaro JP, Bernstein JC, Boschi A, Monroig J, López Piñeiro J. Cohorte de personas viviendo con VIH SIDA en un municipio de la provincia de Buenos Aires. Trabajo libre presentado como póster.

- Abstract 114. XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología SADI 2015. Buenos Aires, 28 al 30 de mayo de 2015.
12. Stagnaro JP, Bernstein JC, Rosales MV, Serrano MI. Situación de las embarazadas conviviendo con VIH en un hospital zonal. Trabajo libre presentado como póster. Abstract 290. XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología SADI 2015. Buenos Aires, 28 al 30 de mayo de 2015.
 13. Ford N, Roberts T, Calmy A. Viral load monitoring in resource-limited settings: a medical and public health priority. *AIDS*; 2012; 26:1719-20.
 14. Jamieson D, Kellerman SE. The 90 90 90 strategy to end the HIV Pandemic by 2030: Can the supply chain handle it? *J Int AIDS Soc*. 2016, 19(1): 20917.
 15. Harries AD, Suthar AB, Takarinda KC, Tweya H, Kyaw NT, Tayler-Smith K, et al. Ending the HIV/AIDS epidemic in low- and middle-income countries by 2030: is it possible? *F1000Res*, 2016; 5: 2328. DOI: 10.12688/f1000research.9247.1
 16. Cesar C, Blugerman G, Valiente JA, Rebeiro P, Sued O, Fink V, et al. The HIV care cascade in Buenos Aires, Argentina: results in a tertiary referral hospital. *Rev Panam Salud Publica* 2016; 40 (6): 448-54.
 17. Bernstein J. Evaluación de la calidad de vida relacionada con la salud en personas que viven con VIH/SIDA. [tesis doctoral]. La Plata, Buenos Aires: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata; 2010. 130p.
 18. Capote Rodríguez A, Ciria Martín A, García Milian AJ, Pérez Piñero JS. Necesidades educativas sobre infecciones de transmisión sexual en adolescentes de La Habana Vieja, Cuba. *Revista Cubana de Salud Pública* 2017; 43 (2): 166-79.
 19. Bobes J, Casas M, Gutiérrez M. Manual de trastornos adictivos 2ª edición. Madrid: Enfoque Editorial, S.C.; 2011.
 20. Organización Panamericana de la Salud. Boletín sobre tuberculosis en la Argentina. Programa Nacional de control de la tuberculosis y

- lepra. Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Buenos Aires; Año 2, marzo 2019.
21. Recoder M, Ziaurriz C, Weller S. Accesibilidad al diagnóstico de VIH en Argentina: estado de situación y propuesta de trabajo. Rev Argent Salud Pública 2012; 3 (11): 37-9.

Autofagia en células β Efecto preventivo de las incretinas ¹

Maiztegui Bárbara y Flores Luis Emilio

Resumen

Objetivo: estudiar el papel de la autofagia en las alteraciones inducidas por una dieta rica en fructosa en la función y la masa de las células β pancreáticas y el posible efecto de las incretinas. Métodos: ratas Wistar normales se alimentaron (3 semanas) con una dieta comercial sin (C) o con 10% de fructosa en agua potable (F) sola o más sitagliptina (CS y FS) o exendina-4 (CE y FE). Se estudiaron los niveles séricos de diferentes parámetros metabólicos / endocrinos, la masa de células β , morfología pancreática, ultraestructura y apoptosis, expresión de VMP1 y secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS). Resultados: las ratas F desarrollaron una tolerancia a la glucosa alterada (TGA) y un aumento significativo en los niveles de triglicéridos plasmáticos, TBARS, insulina, índices HOMA-IR y

¹ Los resultados presentados en el Seminario fueron publicados en: Maiztegui B, Boggio V, Román CL, Flores LE, et al. "VMP1-related autophagy induced by a fructose-rich diet in β -cells: its prevention by incretins". *Clinical Science*. 2017, 13:673-687.

HOMA- β . La reducción significativa de la masa de células β en los animales alimentados con F, se asoció a un aumento de la tasa de apoptosis y a cambios morfológicos y ultraestructurales del páncreas evidenciando actividad autofágica. Todas estas alteraciones se evitaron mediante la administración de sitagliptina o de exendin-4. Conclusiones: nuestros resultados nos permiten concluir que la autofagia relacionada con VMP1 es un proceso reactivo que intenta compensar la disfunción de los islotes inducida por fructosa. Este conocimiento podría ayudar a diseñar estrategias efectivas para prevenir la progresión y el desarrollo de DT2.

Introducción

Para desarrollar nuevas estrategias efectivas en la prevención y tratamiento de la diabetes tipo 2 (DT2) es fundamental dilucidar los mecanismos responsables de la disminución progresiva de la función y de la masa de células β pancreáticas presentes en esta patología (Weyer y otros, 1999) (Kahn y otros, 2009). La masa de células β depende del balance entre la generación de nuevas células por replicación y neogénesis y su pérdida por apoptosis (Butler y otros, 2004). La autofagia, proceso encargado de la degradación y remodelamiento de organelas celulares disfuncionales mediante la activación de la maquinaria lisosómica, se relaciona fuertemente con la apoptosis y está involucrada en la regulación de la supervivencia y función de la célula β . Animales con diabetes inducida por estreptozotocina, presentan un aumento de la autofagia en sus células β junto con un incremento de la proteína de membrana vacuolar (VMP1) (Grasso y otros, 2008), cuya expresión desencadena la formación de autofagosomas Ropolo, 2007) (Vaccaro, 2008) (Molejon, Ropolo, Lo Ré y otros, 2013). Este hecho destaca la importancia del rol de la autofagia en la deficiencia de la masa de células β . Por otra parte, durante un estado de insulinoresistencia (IR) en el que aumenta la secreción de

insulina, la autofagia actuaría como mecanismo de adaptación a los cambios dinámicos que ocurren en las células β (Watada y Fujitani, 2015). Por el contrario, la deficiencia de autofagia contribuye a la pérdida de la masa de células β en la DT2 humana (Masini y otros, 2009).

Por otro lado, la administración de una dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce cambios plurimetabólicos asociados a una disminución de la masa de células β como consecuencia de un aumento de su tasa de apoptosis. Estas alteraciones se asemejan a las encontradas en las personas con alto riesgo de desarrollar DT2. La función y la masa de las células β están positivamente influenciadas por las incretinas como el péptido simil glucagon (GLP-1) (Drucker y Nauck, 2006) pero sus efectos disminuyen significativamente en la DT2 (Nauck y otros, 1986). Dado que las incretinas se degradan rápidamente por la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV), se han utilizado dos enfoques diferentes: el uso de exendina-4, un potente agonista del receptor de GLP-1 resistente a la degradación por DPP-IV (Holst y Orskov, 2004), y la administración de inhibidores de la enzima (Ahrén, 2007).

Nuestro grupo demostró previamente que la administración de exendina-4 y sitagliptina (inhibidor de DPP-IV) a ratas alimentadas con DRF evitó el desarrollo de todas las alteraciones funcionales y morfológicas descritas en este modelo (Maiztegui y otros, 2011). Sin embargo, se desconoce su posible rol modulador sobre la autofagia y, consecuentemente, sobre la apoptosis de estas células.

Objetivo: estudiar el papel de la autofagia en las alteraciones inducidas por una dieta rica en fructosa en la función y la masa de las células β pancreáticas y el posible efecto de las incretinas.

Materiales y Métodos

Grupos experimentales: se alimentaron ratas Wistar macho adultas normales durante 21 días con dieta comercial estándar (C) o con

el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida (F). Los animales de ambos grupos se dividieron aleatoriamente en tres subgrupos: no tratados (C y F), tratados con sitagliptina (115 mg/rata/día; CS y FS) ó con exendina-4 (0,70 nmol/ kg/día; CE y FE). La ingesta de agua y alimentos se midió diariamente, mientras que el peso corporal se registró semanalmente.

Parámetros séricos: Al finalizar el tratamiento, se recogieron muestras de sangre de todos los grupos para medir los niveles de glucosa mediante tiras reactivas, insulina por RIA, triglicéridos utilizando kits comerciales, y la peroxidación lipídica (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico [TBARS]) mediante un ensayo fluorimétrico. La resistencia a la insulina se determinó con el índice HOMA-IR, mediante la fórmula: $[\text{insulina } (\mu\text{U/L}) \times \text{glucosa (mmol/L)}] / 22,5$ y la función de las células β se cuantificó con el HOMA- β mediante la fórmula: $[\text{insulina } (\mu\text{U/L}) \times 20 / \text{glucosa (mmol/L)}] - 3,5$ (Matthews y otros, 1985).

Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG): se administró glucosa (1g/kg de peso corporal) a través de una sonda a 6 ratas de cada grupo experimental y se obtuvieron muestras de sangre a los 0, 30, 60 y 120 minutos para determinar la concentración de glucosa plasmática con tiras reactivas. Los resultados se expresaron como el área bajo la curva de glucosa (ABC) en mmol/L/min.

Estudios inmunohistoquímicos: los páncreas de tres animales de cada grupo experimental fueron fijados en formaldehído al 10% e incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos que fueron desparafinados e incubados en peróxido de hidrógeno (30 minutos) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Luego de ser rehidratados, se incubaron en suero porcino al 2,5%. Finalmente, se incubaron 24 horas a 4 °C en una cámara humidificada con anticuerpo de insulina anti-cobayo (1: 20.000). La tinción se realizó mediante incubación con estreptavidina-biotina (1:40 y 1:20, respectivamente) 30 minutos y tinción con hematoxilina.

Análisis morfométrico: se realizó utilizando un microscopio óptico Jenamed 2 Carl Zeiss y el software OPTIMAS. Se midió: área

pancreática total (excluyendo tejido conectivo) y área de células β del islote (densidad de volumen, V_{vi}). Para estimar la masa de células β del islote, multiplicamos el V_{vi} respectivo por el peso del páncreas total (Bonner y Smith, 1994).

Apoptosis de células β : se registró el porcentaje de células β que presentaban cuerpos apoptóticos identificados por la técnica con yoduro de propidio. Los cortes histológicos se incubaron 30 minutos con una solución de yoduro de propidio (4 $\mu\text{g/ml}$) y ribonucleasa A (100 $\mu\text{g/ml}$), se trataron con sueros no inmunes de cobayo y se incubaron 1 h con el anticuerpo de insulina. Luego se incubaron 45 minutos en cámara oscura con el anticuerpo de cobayo conjugado con fluoresceína y se montaron en Tris-glicerol (pH 8.4) para su análisis con un microscopio de fluorescencia.

Microscopía electrónica de transmisión: Se utilizó un microscopio electrónico Carl Zeiss C-10 y se estudió la integridad de las células β y la presencia o ausencia de gránulos que contienen insulina.

Vacuolización: Las muestras de tejido se fijaron en glutaraldehído al 1% en buffer fosfato 0,1 M y se tiñeron con azul de toluidina al 1% en buffer bórax. Los resultados se expresaron como cantidad de vacuolas/célula/ mm^2 .

Estudios de inmunofluorescencia de VMP1: utilizamos la técnica de marcación indirecta de fluorocromos de Alexa (sondas moleculares). Las secciones de páncreas rehidratadas y desparafinadas se incubaron en buffer citrato de sodio, se bloquearon por una hora en solución de bloqueo y se incubaron con antisuero policlonal de conejo para VMP1 (1:100) y anti-insulina policlonal de cabra (dilución 1: 500) durante la noche a 4° C. Posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios y se montaron en DABCO (Sigma-Aldrich) para su observación con microscopía de fluorescencia.

Aislamiento de islotes y secreción de insulina: se extrajo el páncreas de seis animales de cada grupo y los islotes se aislaron mediante digestión con colagenasa (Lacy, 1967). Se incubaron grupos de 5 islotes durante 60 minutos a 37 °C en 0,6 ml de buffer KRB, pH 7,4,

previamente gaseado con CO₂/O₂ (5%/95%), que contenía 3,3; 8,3 y 16,7 mM de glucosa. Al final del período de incubación, se tomaron alícuotas del medio para medir insulina por RIA.

Análisis estadístico: se realizó mediante el análisis de varianza ANOVA y las pruebas “post hoc” de Bonferroni y Tamhane para comparaciones múltiples. Los resultados se expresaron como media ± EEM. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Peso corporal e ingesta calórica: la ingesta calórica fue comparable en ratas C y F (64,7±4,3 vs. 73,9±3,7 Kcal/rata/día, respectivamente), pero con una distribución porcentual de nutrientes diferente (carbohidratos: proteínas: lípidos: 45:43:2 vs. 63:28:8, respectivamente). Ni la exendina-4 ni la sitagliptina afectaron la ingesta calórica (CE: 63,8±2,3; CS: 62,4±2,5; FE: 77,2±8,1; FS: 69,3±4,5 Kcal/rata/día). En consecuencia, no se registraron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal entre los grupos experimentales, con la excepción del grupo CE cuyo aumento de peso corporal fue menor (C: 88±8; CE: 63±4*; CS: 82±6; F: 74±7; FE: 65±6; FS: 89±5 g; * $p < 0,05$ vs. C).

Mediciones en plasma, índices HOMA y PTOG: como se observa en la tabla 1, no hubo cambios en los valores de glucosa entre los grupos experimentales, sin embargo, los niveles de triglicéridos, TBARS e insulina, así como los índices HOMA-IR y HOMA-β fueron significativamente más altos en ratas F comparadas con C ($p < 0,05$), indicando que las ratas F desarrollaron dislipidemia, IR y estrés oxidativo. Tanto la exendina-4 como la sitagliptina previnieron todas estas anomalías cuando se administraron conjuntamente a ratas F, pero no produjeron ningún efecto en animales C. El área bajo la curva de glucosa (ABC) durante la PTOG fue significativamente mayor en F que en C (Tabla 1), sugiriendo que los altos niveles de insulina en estas

ratas fueron suficientes para mantener los niveles basales de glucosa dentro del rango normal, pero no para hacer frente a la mayor demanda inducida por la carga de glucosa. Una vez más, estos valores altos de ABC en ratas F, volvieron a niveles semejantes al control mediante la administración conjunta de exendina-4 o sitagliptina.

Secreción de insulina: Los islotes de ratas F liberaron cantidades de insulina significativamente mayores que las del grupo C en respuesta a 8,3 y 16,7 mM de glucosa (Figura 1). Sin embargo, no se registraron diferencias entre los grupos frente a concentraciones basales de glucosa. En las ratas F tratadas con exendina-4 o sitagliptina, los valores fueron similares al grupo control.

Análisis morfométrico: el análisis morfométrico demostró que la masa de células β disminuyó significativamente en ratas F (Figura 2A). El tratamiento concomitante con exendina-4 o sitagliptina impidió dicha reducción, obteniéndose valores cercanos a los registrados en C. Si bien el efecto de la exendina-4 fue significativamente mayor que el de la sitagliptina, ninguno de estos fármacos afectó significativamente este parámetro en los animales C.

Apoptosis de células β : el porcentaje de células β apoptóticas fue mayor en F en comparación con las ratas C (Figura 2B). Este aumento de la tasa de apoptosis se evitó mediante la administración conjunta de exendina-4 o sitagliptina, alcanzando valores cercanos a los medidos en ratas C.

Microscopía electrónica y vacuolización: las láminas delgadas teñidas con azul de toluidina y las imágenes de microscopía electrónica obtenidas del páncreas de todos los grupos experimentales, revelaron que la morfología de los islotes es consistente con los resultados bioquímicos (Figuras 3 y 4). Se observó que las células centrales de los islotes de animales F cuadruplicaron el número de vacuolas citoplasmáticas presente en los islotes de ratas C ($p < 0,05$; Figura 3A y B). La administración de exendina-4 o sitagliptina a ratas F redujo significativamente la vacuolización (ratas FE y FS vs. F $p < 0,05$).

Al comparar las características ultraestructurales de los islotes, observamos que las ratas F presentaron células β con núcleos más pequeños con agregación de cromatina, un retículo endoplásmico aumentado y menos gránulos secretores de insulina que las ratas control (tanto las C como las CS y CE; Figura 4A, B, C y E). Estas alteraciones provocadas por la fructosa se evitaron en los animales FS y FE (Figura 4D y F, respectivamente).

La autofagia inducida por fructosa se evidenció por la presencia de autofagosomas (estructuras de membrana doble que contienen material citoplásmico) y autolisosomas (estructuras de membrana única que contienen componentes citoplásmicos en diferentes etapas de degradación) (Figura 4B). Si bien, los animales FS presentaron características autofágicas (Figura 4D), la exendina-4 previno completamente la autofagia inducida por fructosa (Figura 4F).

Detección de VMP1: En los animales F (Figura 5A) se observó una marcada co-localización de VMP1 e insulina, lo que sugiere la presencia de autofagia relacionada con VMP1 en las células β . El aumento de la localización de VMP1 registrado en las células β de ratas FS (Figura 5B) confirma el aumento de autofagia que observamos en los animales FS por microscopía electrónica (Figura 4). Al contrario, la expresión de VMP1 inducida por fructosa en las células β se evitó mediante la administración concomitante de exendina-4 (Figura 5C).

Discusión

Ratas normales alimentadas con una DRF desarrollaron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de triglicéridos, un estado de IR (hiperinsulinemia con normoglicemia y aumento de los índices HOMA-IR y HOMA- β) y un aumento de la liberación de insulina *in vitro* en respuesta a altas concentraciones de glucosa. Estos cambios se asociaron a un aumento del estrés oxidativo (niveles altos de TBARS plasmáticos), una alteración de la tolerancia a

la glucosa y una disminución de la masa celular β como consecuencia de un aumento en la apoptosis. Este último efecto se atribuiría a la combinación de estrés del retículo endoplasmático (Rutkowski, 2004), estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y glucolipototoxicidad (Robertson y otros, 2007) presente en estas ratas. La mayor liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo de ratas F y el aumento de la proporción saturados: insaturados estimularía directamente la apoptosis de las células β (Rebolledo y otros, 2008). Como se demostró anteriormente, la administración conjunta de fructosa y exendin-4 o sitagliptina impidió el desarrollo de todos estos cambios (Maiztegui y otros, 2011).

Actualmente, hemos demostrado que estas alteraciones endócrino-metabólicas observadas en ratas F se asociaron con indicadores morfológicos de autofagia: aumento significativo de la vacuolización, presencia de autofagosomas y autolisosomas en las células β , juntamente con la presencia de un menor número de gránulos de secreción, un retículo endoplásmico aumentado y núcleos de menor tamaño con agregados cromatínicos. La aparición de estos marcadores de autofagia pudo haber sido estimulada por la IR, o el aumento del estrés oxidativo y del retículo endoplasmático que presentan estos animales (He y Klionsky, 2009).

La administración de exendina-4 o sitagliptina a ratas F mejoró las características ultraestructurales del páncreas, sobre todo aumentando el número de gránulos de insulina y reduciendo marcadamente la dilatación del retículo endoplasmático, lo que sugiere que las incretinas previenen el desarrollo de estrés del retículo y protegen a las células β contra la apoptosis. El efecto benéfico de los inhibidores de la DPP-IV y los agonistas del receptor de GLP-1 sobre la masa y función de las células β ha sido ampliamente estudiado en diferentes modelos de DT2 (Farilla y otros, 2002) (Ferreira y otros, 2010), así como en nuestro modelo de prediabetes (Maiztegui y otros, 2011). El aumento significativo de los niveles de VMP1 registrado en los islotes F, sugiere que la autofagia inducida por esta proteína se activa

en las células β como una respuesta protectora contra el daño celular inducido por fructosa. De hecho, la presencia de VMP1, autofagosomas y autolisosomas dejó de ser evidente cuando las alteraciones endócrino-metabólicas inducidas por F se previnieron en los animales FE. Dado que la sitagliptina es un inhibidor de la DPP-IV, el aumento potencial de los niveles activos de GLP-1 circulantes sería menor (dentro del rango fisiológico) que los alcanzados después de la administración de exendina-4 (niveles farmacológicos), y no sería suficiente para prevenir la autofagia inducida por fructosa.

Varios trabajos previos respaldan nuestra suposición: a) la exendina-4 mejora la función de las células β en aquellas células deficientes de autofagia (Abe y otros, 2013), b) la liraglutida (otro análogo de GLP-1), ejerce efectos protectores sobre el páncreas a través de la inducción del proceso de autofagia *in vitro* e *in vivo* (Wang y otros, 2015), c) los inhibidores de DPP-IV restauraron la función de las células β mediante la activación de la autofagia en ratones obesos alimentados con dieta rica en grasa (Villa-Abrille, 2010). La autofagia desempeña un papel importante en la regulación de la función de las células β pancreáticas y de los tejidos diana de la insulina como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo, sugiriendo que la autofagia representaría un mecanismo protector contra el estrés oxidativo (Barlow y Thomas 2015).

En resumen, nuestro estudio actual demostró que:

a) la fructosa aumenta la secreción de insulina y la tasa de apoptosis de las células β ; y desencadena una combinación de estrés glucoxidativo, lipotoxicidad y aumento de la demanda de insulina (IR) que se asocian con un aumento de la autofagia relacionada con una mayor expresión de VMP1;

b) tanto la exendina-4 como la sitagliptina previenen el desarrollo de la mayoría de las alteraciones inducidas por la fructosa en los islotes pancreáticos;

c) solo el tratamiento con exendina-4 fue capaz de prevenir la autofagia inducida por VMP1 desencadenada por fructosa.

En su conjunto, nuestros resultados nos permiten concluir que la autofagia relacionada con VMP1 es un proceso reactivo que intenta compensar la disfunción de los islotes inducida por fructosa. Este conocimiento podría ayudar a diseñar estrategias efectivas para prevenir la progresión y el desarrollo de DT2.

Bibliografía

1. Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M. y otros (1999). "The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus". *J. Clin. Invest.*, 104(6), 787-794.
2. Kahn, S.E., Zraika, S., Utschneider, K.M. y otros (2009). "The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality". *Diabetologia*, 52(6), 1003-1012.
3. Butler, A.E., Jang, J., Gurlo, T. Y otros (2004). "Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes". *Diabetes*, 53(6), 1509–1516.
4. Grasso, D., Sacchetti, M.L., Bruno, L. Y otros (2008). "Autophagy and VMP1 expression are early cellular events in experimental diabetes". *Pancreatology*, 9(1-2), 81-88.
5. Ropolo, A., Grasso, D., Pardo, R. Y otros (2007). "The Pancreatitis-induced Vacuole Membrane Protein 1 Triggers Autophagy in Mammalian". *Cells. J. Biol. Chem.*, 282(51), 37124-37133.
6. Vaccaro, M.I. (2008). "Autophagy and pancreas disease". *Pancreatology*, 8(4-5), 425-429.
7. Molejon, M.I., Ropolo, A., Lo Ré, A. y otros (2013). "The VMP1-Becn1 interaction regulates autophagy induction". *Sci. Rep.*, 3, 1055.
8. Watada, H. y Fujitani, Y. (2015). "Minireview: Autophagy in Pancreatic β -Cells and Its Implication in Diabetes". *Molecular Endocrinology*, 29(3), 338–348.

9. Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R. y otros (2009). "Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells". *Diabetologia*, 52(6), 1083-1086.
10. Drucker, D.J. y Nauck, M.A. (2006). "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes". *Lancet*, 368(9548), 1696-1705.
11. Nauck, M., Stockmann, F., Ebert, R. y otros (1986). "Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes". *Diabetologia*, 29(1), 46-52.
12. Holst, J.J. y Ørskov, C. (2004). "The incretin approach for diabetes treatment modulation of islet hormone release by GLP-1 agonism". *Diabetes*, 53, S197-S204.
13. Ahrén, B. (2007). "Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications". *Diabetes Care*, 30(6), 1344-1350.
14. Maiztegui, B., Borelli, M.I., Madrid, V.G. y otros (2011). "Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased β -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats". *Clin. Sci. (Lond)*, 120(2), 73-80.
15. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S. y otros (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man". *Diabetologia*, 28, 412-419.
16. Bonner-Weir, S. y Smith, F.E. (1994). "Islet cell growth and the growth factors involved". *Trends Endocrinol. Metab.*, 5, 60-64.
17. Lacy, P.E. and Kostianovsky, M. (1967). "Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas". *Diabetes*, 16(1), 35-39.
18. Maiztegui, B., Borelli, M.I., Raschia, M.A. y otros (2009). "Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: β -cell mass, glucokinase, glucose metabolism and insulin secretion". *J. Endocrinol.*, 200(2), 139-149.
19. Rebolledo, O.R., Marra, C.A., Raschia, A. Y otros (2008). "Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin

- resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet”. *Hormone and Metabolic Research*, 40(11), 794-800.
20. Francini, F., Castro, M.C., Schinella, G. Y otros (2010). “Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system”. *Life Science*, 86(25-26), 965-971.
 21. Rutkowski, D.T. y Kaufman, R.J. (2004). “A trip to the ER: coping with stress”. *Trends in Cell Biology*, 14(1), 20-28.
 22. Robertson, R., Zhou, H., Zhang, T. Y otros (2007). “Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes”. *Cell Biochem. Biophys.*, 48(2-3), 139-146.
 23. He, C. y Klionsky, D.J. (2009). “Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy”. *Annu. Rev. Genet.*, 43, 67-93.
 24. Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C. Y otros (2002). “Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats”. *Endocrinology*, 143(11), 4397-4408.
 25. Ferreira, L., Teixeira-de-Lemos, E., Pinto, F. y otros (2010). “Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat)”. *Mediators Inflamm.*, 2010, 1-11.
 26. Abe, H., Uchida, T., Hara, A. y otros (2013). “Exendin-4 improves β -cell function in autophagy-deficient β -cells”. *Endocrinology*, 154(12), 4512-4524.
 27. Wang, J., Wu, J., Wu, H. y otros (2015). “Liraglutide protects pancreatic β -cells against free fatty acids in vitro and affects glucolipid metabolism in apolipoprotein E-/- mice by activating autophagy”. *Mol Med Rep*, 12(3), 4210-8.
 28. Liu, L., Liu, J. y Yu, X. (2016). “Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor MK-626 restores insulin secretion through enhancing autophagy in high fat diet-induced mice”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 470(3), 516-520.
 29. Barlow, A.D. y Thomas, D.C. (2015). “Autophagy in diabetes: β -cell dysfunction, insulin resistance, and complications”. *DNA Cell Biol.*, 34(4), 252-260.

Tablas y figuras

	C	CE	CS	F	FE	FS
Glucosa	114 ± 2,53	108 ± 2,3	112 ± 7,9	111 ± 3,6	110 ± 4,1	114 ± 3,9
Triglicéridos	77 ± 4,8	73 ± 8,3	63 ± 7,2	153 ± 5,4*	104 ± 4,5#	89 ± 12#
Insulina	0,41 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,60 ± 0,06*	0,36 ± 0,03#	0,35 ± 0,04#
TBARS	51 ± 3,5	51,2 ± 4,5	41,8 ± 3,3	67,3 ± 4,7*	50,1 ± 3,8#	39,2 ± 2,8#
HOMA-IR	2,9 ± 0,21	2,4 ± 0,21	3,1 ± 0,54	4,2 ± 0,41*	2,5 ± 0,17#	2,4 ± 0,26#
HOMA-B	29,9 ± 2,3	27,5 ± 3,5	31,4 ± 3,2	46,5 ± 4,8*	25,4 ± 2,4#	23,9 ± 2,9#
ABC	1,63 ± 0,1	1,61 ± 0,09	1,48 ± 0,16	3,11 ± 0,2*	1,50 ± 0,16#	1,65 ± 0,12#

Tabla 1. Niveles séricos de parámetros metabólicos y endócrinos.

ABC: Área bajo la curva de glucosa medida en seis animales de cada grupo y expresada como mmol/L/min. Los valores representan las medias ± EEM de los niveles séricos de glucosa (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), insulina (ng/mL) y TBARS (pmol/mg prot); (n= 20 animales de cada grupo) *p <0,05 vs. C; #p <0,05 vs. F.

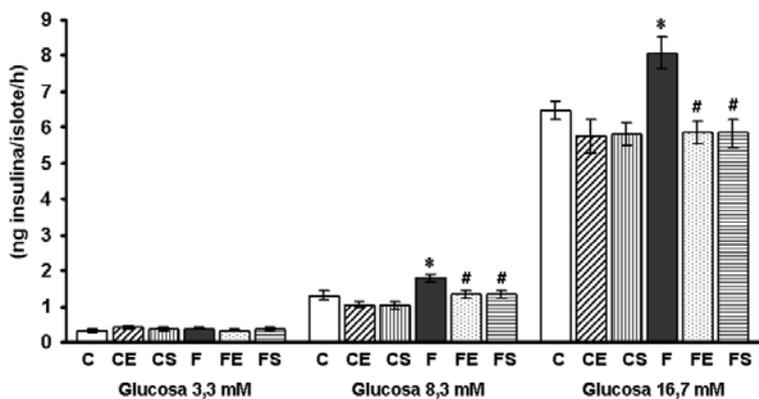


Figura 1. Secreción de insulina inducida por glucosa *in vitro*.

Secreción de insulina inducida por glucosa en islotes aislados de todos los grupos experimentales (n=6 animales por grupo). La insulina liberada en los medios de incubación se expresó en ng de insulina/islote/h; Cada barra representa las medias \pm EEM de seis experimentos independientes. * p < 0,05 vs. C; #p < 0,05 vs. F

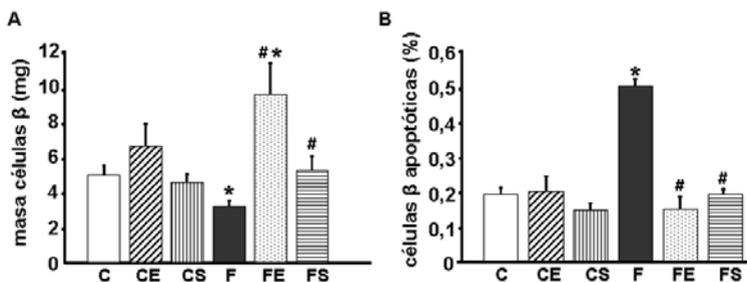


Figura 2. Análisis morfométrico del páncreas.

Análisis morfométrico de la masa de células β (mg) medida en todos los grupos experimentales. Para su estimación, multiplicamos el Vvi correspondiente por el peso del páncreas total. Las barras representan medias \pm EEM. *p < 0,05 vs. C; #p < 0,05 vs. F. B. Análisis morfométrico (medido como %) de la tasa de apoptosis de células β en cada grupo experimental. Las barras representan medias \pm EEM. * p < 0,05 vs. C; #p < 0,05 vs. F. En cada grupo se analizaron 9 preparados proveniente de 3 animales de los cuales obtuvimos 3 cortes tomados a diferentes niveles del bloque de parafina.

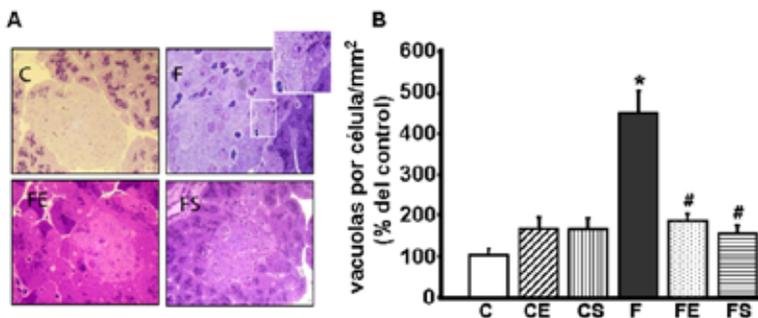


Figura 3. Vacuolización en islotes.

A. Secciones de páncreas teñidas con azul de toluidina provenientes de ratas C, F, FE y FS. El recuadro muestra una celda con gran número de vacuolas a mayor magnitud. B. Cuantificación de vacuolas celulares medidas en todos los grupos experimentales. Los resultados se expresan como vacuolas por célula/mm² en relación con el control (% de control). Las barras representan las medias \pm EEM de 3 casos correspondientes a cuatro animales de cada grupo; * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. F.

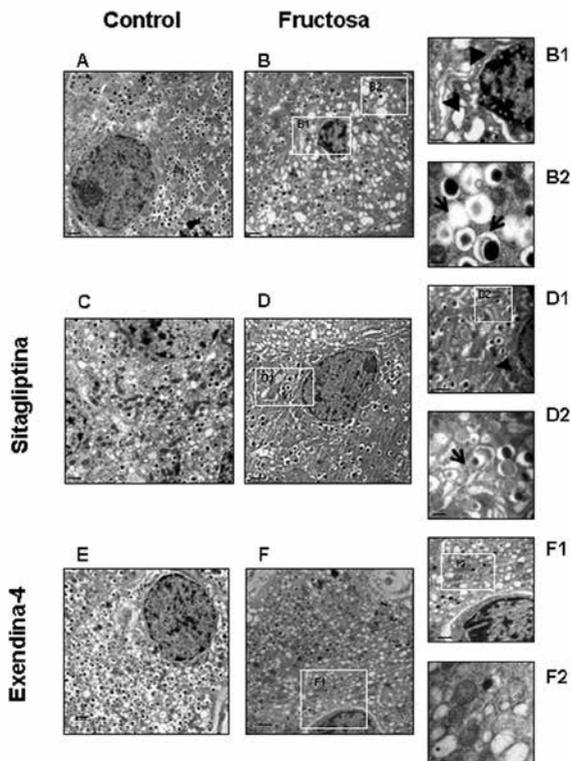


Figura 4. Ultraestructura de células β .

Imágenes de microscopía electrónica de páncreas obtenidos de animales de todos los grupos experimentales: C (A, x7.000), F (B, x7.000; B1, x20.000; y B2, x50.000), CS (C, x7.000), FS (D, x7.000; D1, x20.000; y D2, x50.000), CE (E, x7.000) y FE (F, x7.000; F1, x20.000; y F2, x50.000). Los detalles de las estructuras autofágicas (autofagosoma y autolisosomas señaladas con flechas negras) se muestran en B2 y D2 y las características del retículo endoplasmático (señaladas con triángulos negros) en B1 y D1. Barras de escala: Figura A - D: 1 μ m; Figure B1, D1 y F1: 0,5 μ m; Figura B2, D2 y F2: 200 nm. Las imágenes son representativas de las obtenidas de 4 animales de cada grupo experimental.

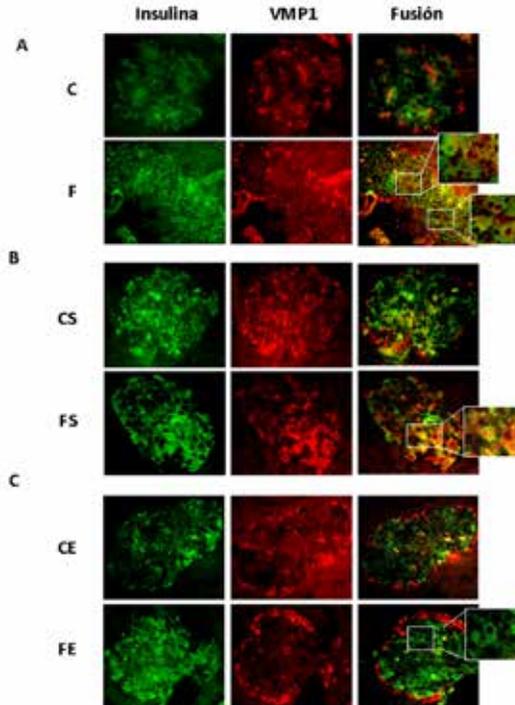


Figura 5. Inmunofluorescencia de VMP1 e insulina.

Secciones de páncreas teñidos por inmunofluorescencia con VMP1 (rojo) e insulina (verde) obtenidos de animales C y F (A); CS y FS (B); CE y FE (C). La simultaneidad de fluorescencia roja y verde (ver imágenes de fusión) indica autofagia relacionada con VMP1 en células β . Aumento X400. Las imágenes son representativas de las obtenidas de páncreas de tres animales de cada grupo experimental.

Señales Intracelulares Involucradas en el Desarrollo de Hipertrofia Cardíaca Patológica

Néstor Gustavo Pérez

Resumen

La hipertrofia cardíaca (HC) es un incremento de la masa muscular en respuesta a cambios hemodinámicos que generan estiramiento mecánico de la pared ventricular. Clásicamente interpretada como una respuesta adaptativa (compensatoria) del miocardio al aumento del estrés parietal, hoy se sabe que es *per se* un factor de riesgo de enfermedad y muerte de origen cardiovascular. La caracterización de las vías de señalización que generan HC constituye un paso clave en la búsqueda de alternativas terapéuticas para combatirla o al menos prevenir su desarrollo excesivo. Nuestro grupo de investigación ha trabajado intensamente en la dilucidación de señales pro-hipertrofiantes que se disparan precozmente luego del estiramiento de la pared miocárdica, y que sostenidas en el tiempo serían responsables del desarrollo de HC. En este marco, hemos identificado una compleja ruta de señalización que incluye la activación secuencial de receptores de angiotensina II (Ang II), de endotelina (ET), de mineralocorticoides y del factor de crecimiento epidérmico, generando estrés oxidativo y la consecuente activación del intercambiador Na^+/H^+

miocárdico (NHE1), sindicado como efector clave para el desarrollo de HC.

Introducción

Es conocido que el estiramiento de la pared ventricular producido por aumento de la carga hemodinámica genera HC. La HC es un incremento de la masa muscular consecuencia del crecimiento de los cardiomiocitos en ancho y/o en largo. Este fenómeno se ha interpretado clásicamente como una respuesta adaptativa (compensatoria) del miocardio ante el aumento del estrés parietal. Sin embargo, ese concepto ha ido cambiando en los últimos años ante la aparición de evidencias claras de que la HC, cualquiera sea su origen, puede ser *per se* un factor de riesgo de enfermedad y muerte de origen cardiovascular (Levy, 1990). En sentido estricto, pareciera existir una HC “apropiada” o “adaptativa” cuando el aumento de masa muscular alcanza para compensar el estrés de la pared, y una “inapropiada” o “maladaptativa” cuando el espesor parietal excede ese límite predisponiendo a la falla funcional (Diez, 2008). En este nuevo escenario, la caracterización de las vías de señalización que generan HC constituye un paso previo crucial para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas tendientes a combatir y/o prevenir su excesivo desarrollo. Entre los diversos factores que pueden inducir HC se encuentra la activación de receptores AT1 de Ang II y ETA de ET. La Ang II es un conocido agente pro-hipertrofiante (Dostal, 1997) (Unger, 2002) que el miocardio produce y libera ante una sobrecarga hemodinámica que el corazón detecta por el estiramiento de su pared (Alvarez, 1999), desencadenando en el propio cardiomiocito señales intracelulares que sostenidas crónicamente producirán HC. Sin embargo, la secuencia exacta de mediadores que llevan a la HC no está plenamente dilucidada, lo cual condiciona fuertemente la búsqueda de herramientas precisas para combatirla. Entre los posibles

disparadores de HC, se ha propuesto que las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Pimentel, 2001) (Sawyer, 2002) serían mediadoras de la activación por Ang II del NHE1, sindicado como efector clave para el desarrollo de HC (Camilion, 2002) (Cingolani, 2003). Es importante recordar que el NHE1 es una proteína integral de membrana que participa en la regulación del pH intracelular removiendo H^+ intracelulares en intercambio con Na^+ que ingresa a la célula, cuya actividad exacerbada provoca aumento de la concentración intracelular de Na^+ , que conduce a un aumento secundario del Ca^{2+} citosólico responsable del disparo de señales de crecimiento celular. Nuestro grupo de investigación ha trabajado durante casi dos décadas en la dilucidación de señales precoces pro-hipertrofiantes, para lo cual hemos puesto el foco en aquellas que se disparan inmediatamente luego del estiramiento de la pared miocárdica. En los siguientes apartados se presentará la metodología utilizada para llevar a cabo las investigaciones y un resumen de resultados obtenidos seguido de una breve discusión de los mismos, incluyendo una posible proyección clínica de nuestros hallazgos.

Metodología

Los experimentos se realizaron en músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo de ratas Wistar macho de 6 meses de edad, los cuales fueron montados en una cámara horizontal entre un transductor de fuerza y un soporte fijo, y sobreperfundidos con buffer bicarbonato. Se registraron contracciones isométricas por estimulación a frecuencia (0.2 Hz) y temperatura (30°C) constantes. La superficie de sección de los músculos (0,75 del producto ancho x espesor) se usó para normalizar los registros de fuerza y poder expresarlos en g/mm^2 . Se midió la longitud inicial de los músculos (sin estirar), para luego estirarlos hasta la longitud a la que desarrollaban la fuerza máxima de contracción (L_{max}). Luego se los acortó hasta obtener el 95% de

la fuerza máxima ($\sim 98\%$ de L_{\max}) y posteriormente hasta el 92% de L_{\max} , longitud la cual se los mantuvo hasta el inicio del protocolo experimental que consistió en un estiramiento súbito desde 92 a 98% de L_{\max} durante 10 min. Se evaluó la variación de fuerza desarrollada antes y después del estiramiento en diferentes condiciones experimentales. Para la determinación de concentración de iones intracelulares por fluorescencia (Ca^{2+} , H^+ , Na^+ , ROS), los papilares fueron cargados con los indicadores fluorescentes apropiados para cada determinación, y montados en una cámara similar a la anterior pero ubicada sobre la platina de un microscopio invertido acoplado a un sistema de detección de fluorescencia. Para la identificación de la fosforilación/activación de quinasas redox sensibles (ERK1/2-p90RSK) por el estiramiento, así como la de su proteína blanco el NHE1, se utilizó la técnica de Western Blot mediante anticuerpos específicos. Se usaron diversos fármacos para identificar la ruta de señalización que se describe en el apartado siguiente: cariporide y EIPA (inhibidores del NHE1), KBR7943 (inhibidor del modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), losartan (bloqueante del receptor AT1 de Ang II), BQ123 (bloqueante del receptor ETA de ET), spironolactona y eplerenona (bloqueantes del receptor de mineralocorticoides “MR”), AG1478 (bloqueante del receptor del factor de crecimiento epidérmico “EGFR”), MPG (“scavenger” = eliminador de ROS), apocinina (inhibidor de NADPH oxidasa), 5HD (bloqueante de canales de K^+ ATP-dependientes de mitocondria). Además de la utilización de estos fármacos, algunos de esos hallazgos se validaron de manera contundente utilizando una técnica de silenciamiento génico (íntegramente desarrollada en nuestro laboratorio) mediante ARN de interferencia ligado a vectores lentivirales, los cuales se inyectaron de manera directa en la pared miocárdica. En tal sentido, se logró silenciar de manera específica la expresión miocárdica del MR, del EGFR y del NHE1 (Brea, 2016) (Diaz, 2014).

Todos los resultados a los que se hace referencia en esta revisión fueron sometidos a estrictos tests estadísticos: ANOVA de una vía,

seguido de Student-Newman-Keuls como test post-hoc, ANOVA de dos vías, o t-test según correspondiera.

Resultados

En el marco de la dilucidación de los mecanismos que subyacen al desarrollo de HC, la identificación de la hiperactividad del NHE1 en el miocardio hipertrófico de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Pérez, 1995) constituye un hallazgo clave. En tal sentido, la **Figura 1** reproduce resultados comparativos de la actividad del NHE1 luego de una carga ácida en músculos papilares de ratas normotensas/normotróficas Wistar Kyoto (WKY) e hipertensas/hipertróficas SHR, pudiéndose observar claramente que para cada valor de pH intracelular el eflujo de H^+ fue siempre mayor en músculos provenientes de ratas SHR, denotando una mayor actividad del intercambiador en el miocardio hipertrófico. Si bien este importante hallazgo no permite establecer una relación causa-efecto entre la hiperactividad del NHE1 y el desarrollo de HC, pareciera razonable pensar que la misma podría existir, dada la enorme responsabilidad que tiene este mecanismo en el acarreo de Na^+ hacia el citosol y lo que ello implica en términos de modulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular, ion responsable de disparar señales de crecimiento celular. El advenimiento de inhibidores específicos del NHE1 como cariporide (HOE642) nos permitió obtener resultados contundentes como para establecer que este mecanismo de membrana era responsable del crecimiento excesivo del miocardio en SHR, ya que inhibiendo crónicamente al intercambiador se podía corregir la HC (Figura 2) y la fibrosis ventricular sin modificar los niveles de presión arterial (Camilion, 2002), mediante un mecanismo que claramente interfería con la activación Ca^{2+} dependiente de la vía hipertrófica calcineurina-NFAT (Ennis, 2007). Motivados por estos resultados que nos permitieron caracterizar las causas de HC en un modelo donde la misma ya estaba plenamente es-

tablecida (animal adulto espontáneamente hipertenso e hipertrófico, ratas SHR), comenzamos a desarrollar la idea de identificar señales precoces que pudieran llevar a la HC. Dado que uno de los eventos claves para disparar HC es el estiramiento de la pared ventricular ante modificaciones en la carga hemodinámica, seguidamente orientamos nuestros proyectos hacia la identificación de posibles señales pro-hipertrofiantes tempranas en músculos papilares aislados de corazones sanos sometidos a estiramiento súbito. Si bien el objetivo inicial era caracterizar la ruta de señalización involucrada en el aumento de fuerza contráctil del músculo cardíaco luego del estiramiento, la idea final era tratar de extrapolar los hallazgos a la condición de estiramiento crónico de la pared causante de HC. Vale recordar, que el estiramiento miocárdico aumenta la fuerza contráctil en dos fases sucesivas: una inmediata, expresión del clásico mecanismo de “Frank-Starling” debido a un incremento de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, y una fase lenta posterior, conocida como segunda fase de fuerza o “SFR” (del inglés *slow force response*), que se estabiliza al cabo de 5-10 minutos y es consecuencia de un incremento del Ca^{2+} intracelular (Alvarez, 1999) (Allen, 1982). La Figura 3 muestra un registro original de un músculo papilar aislado contrayéndose isométricamente, el cual fue súbitamente estirado desde el 92 al 98% de su longitud máxima, pudiéndose identificar claramente las dos fases de aumento de fuerza contráctil post-estiramiento.

El primer resultado que obtuvimos fue muy promisorio porque logramos demostrar que el estiramiento del miocardio es capaz de producir una activación inmediata del NHE1 (que como se dijo es un efector clave para el desarrollo de HC (Camilion, 2002)), mediante un mecanismo autocrino/paracrino que involucra la liberación de factores pro-hipertrofiantes endógenos como Ang II y ET, y que dicho mecanismo es el disparador del incremento de Ca^{2+} responsable de generar la SFR. Basándonos en distintas intervenciones que cancelaban el desarrollo de la SFR, estos primeros hallazgos fueron seguidos por otros no menos importantes que revelaron la enorme compleji-

dad de esta vía de señalización, en la que se destacaba un aumento de la producción de ROS mitocondriales, mediadores que se sabe que participan en procesos pro-hipertrofiantes. La **Figura 4** resume esquemáticamente la ruta de señalización intracelular disparada por el estiramiento de la pared ventricular. Como se dijo antes, el comienzo de esta compleja serie de eventos es la liberación de Ang II y la consecuente activación de su receptor AT1, seguido de liberación de ET y activación de su receptor ETA, activación del MR probablemente por aldosterona endógena, transactivación del EGFR (Villa-Abrille, 2010), activación de NADPH oxidasa y posterior despolarización mitocondrial por apertura de los canales de potasio ATP-dependientes de la mitocondria (mK_{ATP}) (Caldiz, 2007) generando liberación de ROS mitocondriales, activación de quinasas redox-sensibles, estimulación del NHE1 por fosforilación, aumento de $[Na^+]_i$ y subsiguiente aumento de $[Ca^{2+}]_i$ a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} funcionando en modo inverso [30]. El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ es la señal necesaria para generar la SFR, pero también sería una señal pro-hipertrofiante que a través de la calmodulina promovería la migración al núcleo de factores desencadenantes de síntesis proteica si el estímulo mecánico (estiramiento de la pared) se mantuviera en el tiempo. Es importante destacar que además de intervenciones farmacológicas, se utilizó una técnica de silenciamiento génico específico como herramienta para la caracterización de esta ruta de señalización. Esto ha permitido validar contundentemente la participación del MR, del EGFR y del NHE1 en esta vía intracelular, pero, además, dada la estrecha vinculación de estas proteínas con procesos patológicos conducentes a hipertrofia e insuficiencia cardíaca, ha abierto una perspectiva de aplicación clínica de nuestros hallazgos que será discutida brevemente en el apartado siguiente.

En resumen, nuestros resultados permiten sugerir que la misma cadena de eventos que genera la “SFR” sería responsable *in vivo* del desarrollo de HC si el estiramiento parietal persiste crónicamente.

Contamos con evidencias experimentales que sustentan esta hipótesis, pero exceden los objetivos concretos de esta presentación.

Discusión

SFR e hipertrofia miocárdica. El objetivo de este trabajo estuvo orientado a incrementar el conocimiento de las señales intracelulares que se disparan inmediatamente después del estiramiento miocárdico modulando su respuesta contráctil, pero sin descuidar la idea de contribuir a la dilucidación de los mecanismos fisiopatológicos de la HC desde el enfoque de la investigación básica. Mediante un cuidadoso diseño experimental hemos logrado caracterizar una compleja trama de señalización intracelular responsable de adaptar la fuerza contráctil a cambios hemodinámicos rápidos, en la que se destacan la participación de factores de crecimiento, una aumentada producción de ROS, y la activación del NHE1, en un mecanismo claramente análogo al descrito en procesos hipertrofiantes. Sin embargo, pareciera razonable preguntarse por qué pensar que un evento tan rápido y absolutamente necesario para la adaptación de la capacidad contráctil del corazón a cambios hemodinámicos bruscos pudiera a su vez constituir la base de un eventual proceso patológico. Aunque meramente especulativo, no sería descabellado considerar la posibilidad de que la clave para disparar una respuesta “adaptativa” o una “maladaptativa” pudiera radicar simplemente en la duración en el tiempo del estímulo mecánico sobre la pared ventricular: “transitorio” vs. “crónico”. La sorprendente similitud entre los mecanismos que llevan (en lo inmediato) al desarrollo de la SFR y las señales intracelulares que conducen a la HC, invita a pensar que la extrapolación desde la condición aguda a la crónica sería más que una simple especulación. En tal sentido, si bien es importante destacar que muchas intervenciones que cancelan la SFR también son efectivas para prevenir HC, lo cual abona esta idea, no se debe caer en la tentación de simplificar

en extremo un proceso patológico muy complejo que seguramente involucra otras vías de transducción de señales no menos importantes que la descrita por nuestro laboratorio, y que por cuestiones de espacio no serán abordadas en el presente trabajo.

Perspectivas clínicas. El desarrollo de la técnica de silenciamiento génico específico en el miocardio mediante ARN de interferencia nos ha permitido contar con una herramienta valiosísima para demostrar de manera contundente la participación del NHE1 en la cascada de eventos disparada por el estiramiento ventricular (Perez, 2011), así como la de receptores “corriente arriba” del intercambiador como el MR y el EGFR. El hecho de que la activación de estos receptores y del NHE1 haya sido vinculada de manera estrecha al desarrollo de patologías de alta prevalencia en sociedades occidentales como hipertrofia e insuficiencia cardíaca, nos permite especular con la posibilidad de aplicación del conocimiento adquirido en áreas vinculadas a la Salud Pública. Nos detendremos particularmente en la relación del MR con estas patologías. En paralelo con nuestro hallazgo acerca de la participación crítica de este receptor en el desarrollo de la SFR [16, 27], ensayos clínicos tales como RALES (Pitt, 1999), EPHEBUS (Pitt, 2001) y EMPHASIS (Zannad, 2011) mostraban la eficacia en términos de sobrevida de la terapia destinada a bloquear el MR en pacientes con insuficiencia cardíaca. A la luz de nuestros propios resultados, la disminución del estrés oxidativo y la consecuente inactivación del NHE1 por el bloqueo del MR podría ser la base racional de ese beneficioso efecto. Sin embargo, los compuestos disponibles para uso clínico (spironolactona y eplerenona) presentan complicaciones por los efectos colaterales que disparan, entre los cuales la hiperpotasemia puede tener graves consecuencias. Muchos de los pacientes que se beneficiarían con el bloqueo del MR se encuentran en etapas extremas de desarrollo de la enfermedad (actividad de bomba severamente comprometida) a la espera de un trasplante, siendo incapaces de tolerar los efectos adversos de estos fármacos. Más aún, muchos de ellos se ven obligados a recurrir al “corazón artificial”

como puente hacia el trasplante. Este procedimiento requiere cirugías muy complejas, además de elevados costos asociados a la misma y a los cuidados post-operatorios. En estos casos terminales, sería factible reemplazar el uso del corazón artificial por el silenciamiento de la expresión del MR mediante esta técnica biomolecular, estrategia terapéutica que se sumaría al tratamiento convencional de los pacientes. El procedimiento sería factible de ser aplicado mediante la adaptación de una técnica mínimamente invasiva, muy usada en la práctica médica, y con un costo asociado muy inferior al del corazón artificial como lo es el cateterismo izquierdo. Esto permitiría la inyección subendocárdica directa del ARN de interferencia asegurando el bloqueo del MR solamente en miocardio disminuyendo posibles efectos extracardíacos no deseados. Es necesario dejar en claro que la utilización de vectores virales (adenovirus o lentivirus) para promover silenciamiento génico es muy importante en fases experimentales pre-clínicas porque permite mayor sostenimiento en el tiempo del efecto, pero no es recomendable en pacientes. En este contexto, la propuesta aquí esbozada contempla la utilización de ARN de interferencia “desnudo” (“naked”), lo cual evitaría usar vectores virales, técnica que ya hemos aplicado exitosamente en animales de experimentación.

Bibliografía

1. Levy, D., et al., 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 322: 1561-6.
2. Diez, J., 2008. Effects of aldosterone on the heart: beyond systemic hemodynamics? *Hypertension.* 52: 462-4.
3. Dostal, D.E., et al., 1997. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 29: 2893-902.
4. Unger, T., 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 89: 3A-9A; discussion 10A.
5. Sugden, P.H. and A. Clerk, 1998. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med (Berl).* 76: 725-46.
6. Alvarez, B.V., et al., 1999. Mechanisms underlying the increase in force and Ca(2+) transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res.* 85: 716-22.
7. Sadoshima, J., et al., 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 75: 977-84.
8. Cingolani, H.E., et al., 1998. Stretch-induced alkalization of feline papillary muscle: an autocrine-paracrine system. *Circ Res.* 83: 775-80.
9. Pimentel, D.R., et al., 2001. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 89: 453-60.
10. Sawyer, D.B., et al., 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 34: 379-88.
11. Cingolani, H.E., et al., 2006. The effect of xanthine oxidase inhibition upon ejection fraction in heart failure patients: La Plata Study. *J Card Fail.* 12: 491-8.

12. Camilion de Hurtado, M.C., et al., 2002. Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger. *Cardiovasc Res.* 53: 862-8.
13. Cingolani, H.E., et al., 2003. Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na(+)/H(+) exchange inhibition. *Hypertension.* 41: 373-7.
14. Karmazyn, M., A. et al., 2008. The role of NHE-1 in myocardial hypertrophy and remodelling. *J Mol Cell Cardiol.* 44: 647-53.
15. Brea, M.S., et al., 2016. Epidermal Growth Factor Receptor Silencing Blunts the Slow Force Response to Myocardial Stretch. *J Am Heart Assoc.* 5. DOI - 10.1161/JAHA.116.004017.
16. Diaz, R.G., et al., 2014. Myocardial mineralocorticoid receptor activation by stretching and its functional consequences. *Hypertension.* 63: 112-8.
17. Perez, N.G., et al., 2011. Silencing of NHE-1 blunts the slow force response to myocardial stretch. *J Appl Physiol.* 111: 874-80.
18. Perez, N.G., et al., 1995. pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H+ exchanger. *Circ Res.* 77: 1192-200.
19. Ennis, I.L., et al., 2007. Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na+/H+ exchanger-1 (NHE-1) inhibition. *Can J Physiol Pharmacol.* 85: 301-10.
20. Allen, D.G. and S. Kurihara, 1982. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 327: 79-94.
21. Cingolani, H.E., et al., 2013. The Anrep effect: 100 years later. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 304: H175-82.
22. Bendall, J.K., et al., 2002. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 105: 293-6.

23. Suzuki, Y.J., et al., 2005. Redox control of growth factor signaling: recent advances in cardiovascular medicine. *Antioxid Redox Signal.* 7: 829-34.
24. Rosenbaugh, E.G., et al., 2013. Antioxidant-based therapies for angiotensin II-associated cardiovascular diseases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 304: R917-28.
25. Sadoshima, J. and S. Izumo, 1997. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 59: 551-71.
26. Ennis, I.L., et al., 2005. Endothelin isoforms and the response to myocardial stretch. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: H2925-30.
27. Caldiz, C.I., et al., 2011. Mineralocorticoid receptor activation is crucial in the signalling pathway leading to the Anrep effect. *J Physiol.* 589: 6051-61.
28. Villa-Abrille, M.C., et al., 2010. The Anrep effect requires transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Physiol.* 588): 1579-90.
29. Caldiz, C.I., et al., 2007. Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium. *J Physiol.* 584: 895-905.
30. Perez, N.G., et al., 2001. Reverse mode of the Na^+ - Ca^{2+} exchange after myocardial stretch : underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res.* 88: 376-82.
31. Pitt, B., et al., 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 341: 709-17.
32. Pitt, B., et al., 2001. The EPHESUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 15: 79-87.
33. Zannad, F., et al., 2011. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med.* 364: 11-21.

34. Kagiya, S., et al., 2002. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation*. 106: 909-12.
35. Zeng, S.Y., et al., 2013. Upregulation of Nox4 promotes angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor activation and subsequent cardiac hypertrophy by increasing ADAM17 expression. *Can J Cardiol*. 29: 310-9.
36. Ito, H., et al., 1993. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 92: 398-403.
37. Sabri, A., H.H. et al., 2006 Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal*. 5: 731-40.
38. Nagata, K., et al., 2006. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension*. 47: 656-64.
39. Cingolani, H.E., et al., 2008. Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1. *Front Biosci*. 13: 7096-114.

Leyendas de las Figuras

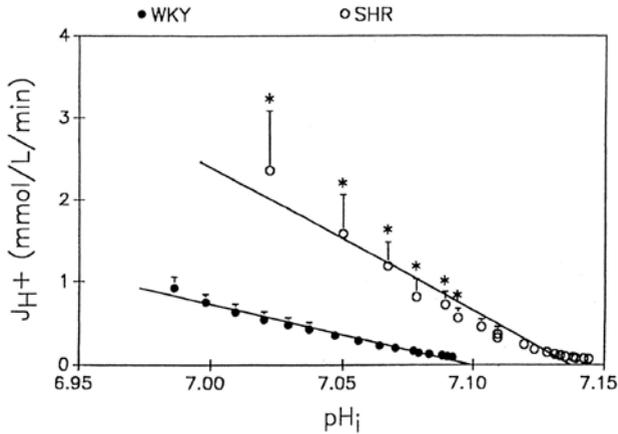


Figura 1. Eflujo de H^+ mediado por el NHE1 luego de una carga ácida en músculos papilares de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas (WKY). Nótese que para cada valor de pH intracelular (pH_i) el eflujo de H^+ fue siempre mayor en músculos del miocardio hipertrófico de SHR denotando una mayor actividad del intercambiador. (Reproducido de Pérez NG y col. 1995 [18]).

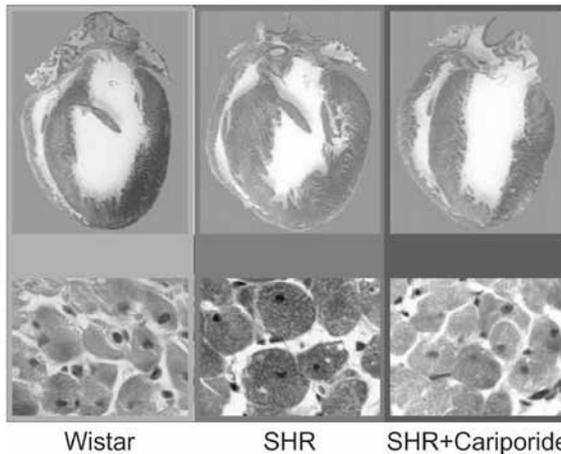


Figura 2. El bloqueo crónico del NHE1 con Cariporide regresó la hipertrofia miocárdica en ratas SHR. Los paneles superiores muestran comparativamente

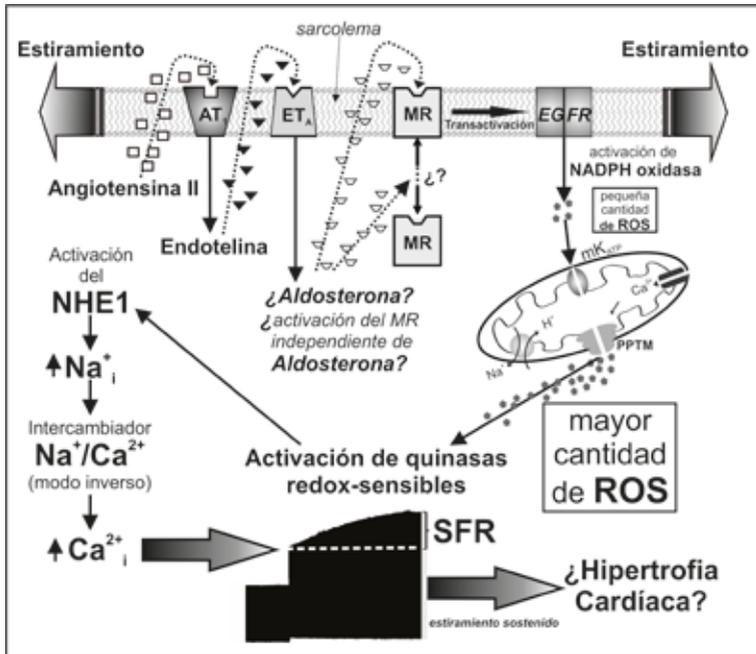


Figura 4. Esquema representativo de la ruta de señalización intracelular disparada por el estiramiento del miocardio responsable del desarrollo de la fase lenta de aumento de fuerza post-estiramiento (“SFR”), y probablemente de hipertrofia cardíaca si el estímulo mecánico persiste en el tiempo. Los signos de interrogación destacan aspectos del mecanismo que no hemos comprobado experimentalmente, o bien aquellos cuya evidencia experimental no se describe en el presente trabajo. PPTM: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.

Infarto miocárdico producido por isquemia-reperfusión

Susana M. Mosca

Resumen

La oclusión severa de una arteria coronaria y la reperfusión inmediata de la misma causan la muerte celular (infarto) simultáneamente con un deterioro de la función contráctil del miocardio. La sobrecarga de calcio y la producción de especies reactivas del oxígeno son los principales agentes responsables del daño miocárdico por isquemia-reperfusión. Estas señales patológicas convergen en la mitocondria provocando la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PPTM), la liberación de factores involucrados en la muerte celular y el proceso de fisión mitocondrial. Es así, que la protección ejercida por distintas intervenciones, como el pre y post-acondicionamiento isquémicos y tratamientos farmacológicos está relacionada a la inhibición de la formación del PPTM y de la fragmentación mitocondrial. Por lo tanto, las posibles nuevas terapias cardioprotectoras serán aquellas que puedan bloquear ó atenuar la permeabilidad y la fisión mitocondrial.

Palabras Clave: Isquemia, reperfusión, PPTM, pre y post-acondicionamiento isquémicos, fisión-fusión.

1. Introducción

1.1. Sistema circulatorio

El sistema circulatorio está encargado de bombear y distribuir la sangre por todo el organismo. Está formado por cuatro componentes, un órgano impulsor, el corazón, el sistema arterial, los capilares y el sistema venoso. Estos componentes forman el **circuito mayor o sistémico** que transporta sangre oxigenada por el sistema arterial (que se inicia con la arteria aorta) desde el corazón hasta los tejidos. La sangre desoxigenada (con alta cantidad de CO_2) retorna al corazón a través de las venas cavas. El otro camino, el llamado **circuito menor ó pulmonar** transporta sangre desoxigenada mediante la arteria pulmonar desde el corazón hasta los pulmones y la sangre oxigenada vuelve al corazón a través de la vena pulmonar.

1.2. Corazón

El corazón es un órgano muscular hueco, que consta de cuatro cavidades o cámaras, las dos superiores denominadas **aurículas** (derecha e izquierda) y las dos inferiores **ventrículos** (derecho e izquierdo), separadas por los correspondientes tabiques interauricular e interventricular. Ambas cámaras están comunicadas a través de válvulas que responden a diferencias de presiones. Las **válvulas auriculo-ventriculares** (AV) permiten que la sangre fluya de las aurículas a los ventrículos: la derecha (tricúspide) conecta las cavidades derechas, y la izquierda (bicúspide ó mitral) conecta las cavidades izquierdas. Las **válvulas semilunares** (pulmonar ó derecha y aórtica ó izquierda), conectan a los ventrículos con las arterias respectivas. El corazón está formado por músculo estriado, que participa del proceso contráctil y el sistema especializado de conducción. Este

último está formado por células musculares que son capaces de generar y conducir el impulso cardíaco, necesario para la contracción miocárdica. La nutrición del corazón ocurre a través de las **arterias coronarias**, (derecha e izquierda) que son las primeras ramas de la aorta. Para el normal funcionamiento cardíaco es necesario que el aporte de oxígeno sea el necesario para satisfacer las demandas del tejido miocárdico.

2. Isquemia-reperusión: alteraciones

La isquemia miocárdica es el desequilibrio entre el aporte de oxígeno, dado por el flujo coronario y las demandas de dicho nutriente por el corazón. Es decir, que cuando el flujo coronario se interrumpe por ej. por oclusión de una arteria coronaria, el oxígeno disponible y la síntesis de ATP aeróbico disminuyen. Esto provoca un daño, cuya magnitud depende de la duración de la oclusión. La única herramienta disponible para recuperar el tejido lesionado es restablecer el flujo mediante la **reperusión** de la arteria ocluida. Sin embargo, esta estrategia puede en sí misma agravar la injuria. Las alteraciones por **isquemia-reperusión** son: atontamiento miocárdico (disminución de la contractilidad miocárdica post-isquemia), arritmias e infarto (muerte celular).

2.1. Mecanismos responsables

Durante la isquemia se estimula la generación de ATP anaeróbico por la vía glucolítica y se produce un aumento de la producción de lactato. Esto produce la acidificación intracelular, lo que lleva a la activación del intercambiador Na^+/H^+ , que produce la salida de H^+ hacia el extracelular y la entrada de Na^+ al citosol. Este aumento de la concentración intracelular de Na^+ activa el modo "reverso" del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, provocando un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Figura 1). Durante la reperusión, la reactiva-

ción de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ conduce a la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} (Piper, 2003) (Yellon, 2007).

Simultáneamente, al restablecerse la provisión de oxígeno, se genera una mayor cantidad de las especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs) (Figura 2). Entre ellas están el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el anión hidroxilo ($\text{OH}^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$). La principal fuente de producción de EROs es la cadena respiratoria de la mitocondria (Granger, 2015).

El nivel celular de EROs depende del balance entre la producción y la remoción de las mismas. En condiciones fisiológicas, los efectos perjudiciales de EROs son contrarrestados por los sistemas antioxidantes, entre los cuales están los enzimáticos [enzimas catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx)] y los no enzimáticos (albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, ferritina, ácido úrico etc). Durante la isquemia-reperfusión se produce el desequilibrio (Figura 3).

3. Mitocondrias

Las mitocondrias son organelas capaces de amortiguar el aumento citosólico de Ca^{2+} , pero este proceso es limitado. Una baja concentración de Ca^{2+} mitocondrial está asociada a la acidosis y a una alta concentración de ADP (lo que ocurre durante la isquemia) que impiden la apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM) y por lo tanto se mantiene la impermeabilidad de la membrana mitocondrial y su potencial (Lesnefsky y otros, 2001) (Tsujiimoto, 2006). La producción de EROs y la sobrecarga de Ca^{2+} , eventos que ocurren durante la perfusión, favorecen la formación y la apertura del PPTM produciendo un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Griffiths, 1995) (Hom y otros, 2010) (Willems y otros 2015).

3.1. Poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)

El mantenimiento del gradiente de protones y la impermeabilidad de la membrana interna son condiciones necesarias para el normal funcionamiento de las mitocondrias. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, la permeabilidad de la membrana mitocondrial puede aumentar con la formación de un poro inespecífico dependiente de voltaje, conocido como PPTM (Figura 4). Este poro permite la entrada de agua y moléculas de hasta 1,5 kD y por lo tanto induce hinchazón de los orgánulos de la matriz.

Como resultado del edema mitocondrial ocurre la ruptura de la membrana mitocondrial externa y la liberación de proteínas pro-apoptóticas en el citosol. Los principales componentes del PPTM son la nucleótido adenina translocasa (ANT), la ciclofilina D (CyP-D) y un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa (Tsujimoto, 2006). Trabajos previos muestran que el PPTM es un evento crucial en el daño miocárdico producido por isquemia-reperusión. Así, intervenciones y/o tratamientos farmacológicos que reducen la formación del PPTM disminuyen el tamaño del infarto y mejoran la recuperación de la contractilidad miocárdica (Borutaite, 2003) (Shanmuganathan y otros, 2005).

3.2. Dinámica mitocondrial

Este término se refiere al remodelado de la ultraestructura mitocondrial y la condensación de su matriz. Comprende dos procesos: fisión y fusión, que clásicamente son considerados como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (Scalettar, 1991). La fisión mitocondrial está regulada principalmente por la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp-1) y la proteína de fisión 1 (Fis1), mientras que en la fusión participan las proteínas mitofusinas (Mfn 1/2) y la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) (Figura 5). Estudios previos (Ong, 2013) (Maneechote, 2018) (Li, 2018) muestran que el aumento

de la fisión mitocondrial está involucrado en la muerte de cardiomiocitos producida por isquemia-reperusión.

4. Estrategias cardioprotectoras

4.1. Pre y Post-acondicionamiento isquémicos

Numerosos trabajos señalan como un mecanismo cardioprotector al fenómeno llamado “preacondicionamiento isquémico” (PI) descrito por Murry y col en 1986 (Murry, 1986). Esta intervención se basa en que breves episodios de isquemia seguidos de reperusión aplicados previamente a la isquemia de mayor duración, disminuyen las alteraciones ocasionados por la isquemia-reperusión (Yellon, 2003). La primera aplicación clínica del PI fue un estudio realizado por el grupo de Yellon en 1993, al que le siguieron otros estudios (Jenkins y otros 1997) (Ikonomidis y otros, 1994).

Zhao y col, en 2003 (Zhao y otros, 2003) demostraron que la aplicación de breves períodos de isquemia seguidos de reperusión al inicio de la reperusión era capaz de reducir el tamaño del infarto. Este fenómeno llamado post-acondicionamiento isquémico (POS), proporcionó una herramienta que puede ser aplicada en el momento de la reperusión, lo que facilita su aplicación a pacientes con infarto agudo de miocardio (Laskey, 2005) (Staat y otros 2005). Estudios de nuestro laboratorio, realizados en corazón aislado de rata (Figura 6) muestran la acción cardioprotectora del PI y POS (Mosca y otros 1999). En estos experimentos, la aplicación de 5 min de isquemia seguidos de 10 min de reperusión previos a la isquemia de mayor duración (protocolo de PI), así como la aplicación de 3 ciclos breves de isquemia/reperusión al inicio de la reperusión (protocolo de POS) disminuyeron el tamaño del infarto y aumentaron la recuperación postisquémica de la función sistólica y diastólica miocárdicas.

En cuanto a los mecanismos de protección existen estudios que muestran que el PI y el POS utilizan vías de señalización similares

(Hausenloy, 2007). La interacción de ligandos, tales como la adenosina y opiáceos, con receptores de membrana lleva a la activación de distintas quinasas como la proteína quinasa C (PKC), el complejo fosfatidilinositol-3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) (39), la glucógeno sintetasa quinasa-3 β (GSK-3 β) y la interacción entre ellas en las distintas cascadas de señalización (Liu, 1994) (Vasalli, 2012) (Tong y otros 2002). También el NO, formado por activación de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), directa ó indirectamente a través de la activación de la guanilato ciclasa (GC) es un factor importante en la cardioprotección (Bolli, 2011).

Varios estudios mencionados en una revisión reciente (Pagliaro y otros, 2018) establecen que las vías de señalización que incluyen las quinasas mencionadas convergen finalmente en las mitocondrias, reduciendo la probabilidad de apertura del PPTM (Figura 7).

4.2. Tratamientos farmacológicos

Además el PI y POS distintos tratamientos farmacológicos pueden proteger al miocardio contra la injuria por isquemia-reperusión. Experimentos de nuestro laboratorio demuestran que el tratamiento con inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ , como el cariporide, inhibidores de la GSK-3 β , como el cloruro de litio, reducen el tamaño del infarto y aumentan la recuperación post-isquémica de la contractilidad (Mosca, 2000) (Fantinelli, 2006) (Garciaarena y otros 2008).

Efectos cardioprotectores similares obtuvimos mediante la utilización y administración de un extracto no-alcohólico de vino tinto y extractos acuosos de yerba mate, arándanos, cacao etc (Fantinelli, 2007) (González y otros 2006). La acción beneficiosa de estos extractos ha sido atribuida a los compuestos polifenólicos (Figura 8), los que pueden activar vías semejantes al PI y POS llevando a una disminución de la formación del PPTM, preservando así la integridad mitocondrial.

5. Conclusiones

De acuerdo con los antecedentes mencionados parece ser que las mitocondrias además de su papel esencial en la producción de energía, controlan la muerte celular mediante la formación y/o apertura del PPTM y de los procesos de fisión y fusión mitocondrial. Es así que, intervenciones como el PI, el POS y tratamientos farmacológicos protegen al miocardio contra los daños producidos por la isquemia-reperfusión atenuando la formación de dicho poro y la fisión mitocondrial. Por lo tanto, el hallazgo de nuevas terapias farmacológicas cardioprotectoras se centrará en aquellas drogas quemantengan la integridad funcional y estructural de la mitocondria.

Bibliografía

- 1- Piper, H. M1., Meuter, K., Schäfer, C. (2003). Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 75(2):S644-8.
- 2- Yellon, D.M., Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Eng J Med*, 107:1121-1135.
- 3- Granger, D.N., Kvietys, P.R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6: 524-551.
- 4- Lesnefsky, E.J., Moghaddas, S., Tandler, B. y otros (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 33:1065-1089.
- 5- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., Shimizu, S. (2006). Mitochondrial permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1757:1297-1300.
- 6- Griffiths, E.J., Halestrap, A.P. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*, 307:93-98.

- 7- Hom, J., Yu, T., Yoon, Y. y otros. (2010). Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. *Biochim. Biophys Acta*, 1797: 913–21.
- 8- Willems, P.H., Rossignol, R., Dieteren, C.E. y otros (2015). Redox homeostasis and mitochondrial dynamics, *Cell Metab*, 22: 207–218.
- 9- Borutaite, V., Jekabsone, A., Morkuniene, R., y otros (2003). Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol.*, 35:357-366.
- 10- Shanmuganathan, S., Hausenloy, D.J., Duchen, M.R. y otros (2005). Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289: H237-H242.
- 11- Heusch, G., Boengler, K., Schulz, R. (2010). Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic. Res. Cardiol.*, 105:151-653.
- 12- Scalettar, B.A., Abney, J.R., Hackenbrock, C.R. (1991). Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 8057-61.
- 13- Ong, B., Hall, A.R., Hausenloy, D.J. (2013). Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease, *Antioxid. Redox Signal*, 19: 400–414.
- 14- Manechote, C., Palee, S., Kerdphoo, S. y otros (2018). Differential temporal inhibition of mitochondrial fission by Mdivi-1 exerts effective cardioprotection in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Clin Sci (Lond)*, 132(15):1669-1683.
- 15- Li, Y., Liu, X. (2018). Novel insights into the role of mitochondrial fusion and fission in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion. *J Cell Physiol.*, 233(8):5589-5597.
- 16- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5):1124-1136.

- 17- Yellon, D.M., Downey, J.M. (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.*, 83(4):1113-1151.
- 18- Yellon, D.M., Alkhulaifi, A.M., Pugsley, W. B. (1993). Preconditioning the human myocardium, *Lancet*, 342: 276-277.
- 19- Jenkins, D.P., Pugsley, W.B., Alkhulaifi, A.M. y otros (1997). Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart*, 77:314-318.
- 20- Ikonomidis, J.S., Tumiati, L.C., Weisel, R. D. y otros (1994) . Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res.*, 28(8):1285-1291.
- 21- Zhao, Z.Q., Corvera, J.S., Halkos, M. E. y otros (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285:H579-H588.
- 22- Laskey, W.K. (2005). Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv.*, 65: 361-367.
- 23- Staat, P., Rioufol, G., Piot, C. y otros (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation*, 112:2143-148.
- 24- Mosca, S.M., Salas, M.A., Portiansky, E. L. y otros (1999). Early ischemic preconditioning protects from infarct and myocardial stunning in isolated rat heart. *Exp Clin Cardiol*, 4(1):43-48.
- 25- Fantinelli, J.C., Mosca, S.M. (2007). Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Mol Cell Biochem*, 296: 45-51.
- 26- González Arbeláez, L.F., Ciocci Pardo, A., Fantinelli, J.C. y otros (2016). Cyclosporine-A mimicked the ischemic pre and postconditioning-mediated cardioprotection in hypertensive rats: role of PKCε. *Exp Mol Pathol*, 100(2):266-275.

- 27- Hausenloy, D.J., Yellon, D.M. (2007). Preconditioning and post-conditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther*, 116:173-191.
- 28- Liu, Y., Ytrehus, K., Downey, J. M. (1994). Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 26:661-668.
- 29- Vassalli, G., Milano, G., Moccetti, T. (2012). Role of mitogen-activated protein kinases in myocardial ischemia-reperfusion injury during heart transplantation. *J Transplant*, 2012:928954.
- 30- Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., y otros (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res.*, 90(4):377-379.
- 31- Bolli, R. (2011). Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*, 33(11):1897-1918.
- 32- Pagliaro, P., Femminò, S., Popara, J. y otros (2018). Mitochondria in Cardiac Postconditioning. *Front Physiol*, 26;9:287.
- 33- Mosca, S.M., Cingolani, H.E. (2000). Comparison of the protective effects of ischemic preconditioning and the Na⁺/H⁺ exchanger blockade. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 362(1):7-13.
- 34- Fantinelli, J.C., Cingolani, H.E., Mosca, S.M. (2006). Na⁺/H⁺ exchanger inhibition at the onset of reperfusion decreases the myocardial infarct size: role of ROS. *Cardiovasc Pathol*, 15/4: 179-184.
- 35- Garcarena, C.D., Caldiz, C.I., Correa, M.V. y otros (2008). Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action. *J Appl Physiol*, 105(6):1706-13.
- 36- González Arbeláez, L.F., Pérez Núñez, I.A., Mosca, S.M. (2013). GSK-3β inhibitors mimic the cardioprotection mediated by ischemic pre-and postconditioning in hypertensive rats. *Bio Med Res Inter*, 2013: Article ID 317456.
- 37- Fantinelli, J.C., Mosca, S.M. (2007). Cardioprotective effects of a non-alcoholic extract of red wine during ischemia and reperfusion

- in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(3):166-169.
- 38- González Arbeláez, L.F., Fantinelli, J., Ciocci Pardo, A. y otros (2016). Effect of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat heart: mechanisms involved. *Food & Function*, 7(2):816-824.
- 39- González Arbeláez, L.F., Ciocci Pardo, A., Fantinelli, J.C. y otros (2016). Ex vivo treatment with a polyphenol-enriched cocoa extract ameliorates myocardial infarct and postischemic mitochondrial injury in normotensive and hypertensive rats. *J Agric Food Chem*, 64(25):5180-5187.
- 40- Fantinelli, J.C., Cuéllar Álvarez, L.N., González Arbeláez, L.F. y otros (2017). Acute treatment with copoazú fermented extract ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via eNOS activation. *J Funct Foods*, 34: 470-477.

Leyendas para las figuras



Figura 1: Eventos celulares que ocurren durante la isquemia

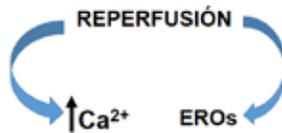


Figura 2: Eventos desencadenados por la reperfusión

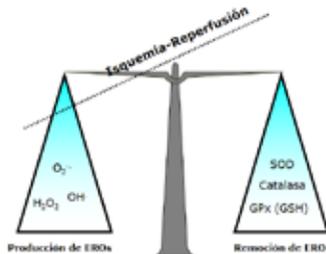


Figura 3: Desequilibrio entre la producción y la remoción de EROs que tiene lugar durante la isquemia-reperfusión

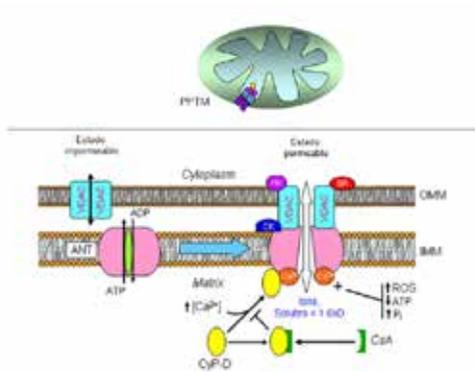


Figura 4: Esquema del estado impermeable (componentes desalineados) y estado permeable (componentes alineados) del PPTM.

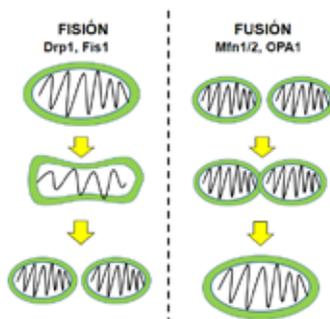


Figura 5: Procesos de fisión y fusión mitocondrial

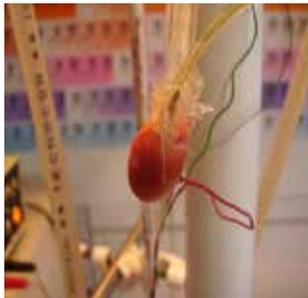


Figura 6: Esquema experimental

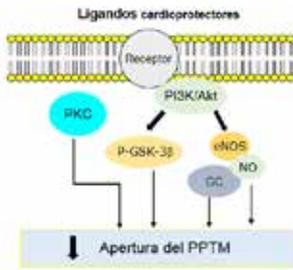


Figura 7: Cascadas cardioprotectoras del PI y POS



Figura 8: Estructura polifenólica de los componentes mayoritarios de la uva, yerba mate, arándanos y cacao

Exosomas y neoplasias malignas

Martín Enrique Rabassa

El concepto de Neoplasia Maligna

La transformación de una célula normal en una célula neoplásica maligna es un proceso en el cual intervienen diversos fenómenos, los cuales no han sido completamente aclarados. La idea de que las neoplasias malignas se constituyen como tales por la mera acumulación de mutaciones en sus genes ha sido reemplazada por una visión más amplia e integradora (Hanahan, 2011). Como parte del proceso de transformación maligna se incluyen eventos relacionados con cambios en el metabolismo celular, la relación con el microambiente tumoral y, particularmente, con el sistema inmune del huésped. Sin embargo, en el corazón de la patogenia de la transformación neoplásica permanecen las mutaciones como el incidente iniciador del fenómeno neoplásico maligno (Prat, 2011).

El modelo actual de carcinogénesis incluye tres vías por las cuales es posible iniciar la transformación neoplásica. A través de la acumulación de mutaciones por acción de carcinógenos exógenos o endógenos, por la acumulación estocástica de errores en las células de reserva de los distintos tejidos o por la herencia de mutaciones en

genes en la línea germinal, que predisponen al cáncer (Braakhuis, 2004). En los primeros dos casos el tiempo (en cuanto a la duración de la exposición o la edad del individuo) es la variable principal que determina el riesgo de transformación; la diferencia entre ambos radica en que la acumulación al azar de errores no puede ser objeto de acciones de prevención, al menos con las herramientas médicas hoy disponibles (Tomasetti, 2017).

Cuáles son los genes que se alteran también resulta de relevancia. Entre las mutaciones que tienen lugar, muchas no tendrán efectos sobre los diversos sistemas de la célula que controlan, por ejemplo, la división celular, la senescencia, el metabolismo, la reparación de errores en el genoma, etc. Otras, en cambio, modifican de forma irreversible las vías de organización de estos sistemas, confiriendo nuevas capacidades a las células transformadas. Hanahan D. y Weinberg R (Hanahan, 2000-2011) han resumido estas capacidades en las siguientes categorías: 1. Obtención de señales proliferativas en forma sostenida. 2. Evasión de las señales de supresión de crecimiento. 3. Resistencia a la muerte celular. 4. Obtención de inmortalidad replicativa. 5. Inducción de angiogénesis. 6. Activación de la invasión tisular y metástasis. 7. Desregulación del metabolismo. 8. Evasión del sistema inmune. A estas ocho capacidades, que pueden observarse en la mayoría de los tumores, se agregan dos características, presentes en algunos tumores malignos, que favorecen el desarrollo neoplásico al ayudar el establecimiento de las capacidades que mencionamos previamente. 1. La inestabilidad del genoma, es decir la propensión de la célula a no reparar y acumular gran cantidad de mutaciones rápidamente. 2. La promoción de la inflamación en el tumor, lo que facilita el crecimiento, la invasión y angiogénesis.

En el modelo de Hanahan y Weinberg la acumulación sucesiva y o simultánea de las capacidades mediante nuevas mutaciones determina el surgimiento de una neoplasia maligna. Estas capacidades y características de los tumores malignos pueden manifestarse por cambios en la organización de las vías metabólicas y de señalización

internas de la célula o la comunicación con su entorno o microambiente tumoral.

Las alteraciones internas se relacionan con la adquisición de mutaciones genéticas, cambios en la regulación de expresión de los genes o cambios epigenéticos (desde la metilación del DNA hasta la glicosilación de proteínas). Estos fenómenos han sido exhaustivamente estudiados y definen la transformación neoplásica desde un modelo emitentemente celular. Las alteraciones en la comunicación de las células tumorales con el exterior exigen la utilización de modelos de mayor complejidad.

Microvesículas y exosomas

Las células pueden secretar al exterior una serie de estructuras membranosas, derivadas tanto de la membrana plasmática como de organelas internas, las microvesículas (MVs) derivadas de la membrana plasmática son de mayor tamaño, alcanzando los 1000 nm y poseen una marcada heterogeneidad en su composición, tanto en su membrana como en su contenido. Se las denomina MVs grandes o micropartículas (Colombo, 2014).

Por otro lado, las MVs derivadas del compartimento endosomal, formadas por gemación al interior de los llamados cuerpos multivesiculares (figura 1) y posterior fusión de la membrana limitante de estos con la membrana plasmática, se denominan MV pequeñas o exosomas (Raposo, 2013). Estas MVs poseen un tamaño que oscila entre 50 y 200 nm y una composición más homogénea, con una serie de proteínas de membrana características del compartimento de origen, como las tetraspaninas y un contenido equivalente al citoplasma celular, enriquecido en ARN codificante y, particularmente, ARN no codificante y probablemente ADN. Si bien inicialmente se consideró a las MVs como un producto de la eliminación de desechos celulares, hace unos 15 años se las reconoce como vehículos de transmisión de

información biológica relevante entre células, tanto en forma paracrina como a distancia (Tkach, 2016).

La secreción de exosomas es una función biológica bien definida en la gran mayoría de los distintos tipos celulares. Cuando la célula se estresa o sufre transformación neoplásica se producen cantidades crecientes y las MVs pasan a la circulación sanguínea donde pueden ser detectadas (Armstrong, 2018).

Las células presentadoras de antígenos profesionales, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas liberan, en comparación con otros tipos celulares, mayores cantidades de MVs del tipo exosomas (Lindenbergh, 2018). Estos MVs poseen en sus membranas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II cargadas con péptidos. Es probable que una de las funciones más relevantes de los exosomas, desde el punto de vista fisiológico, sea algún tipo de comunicación o regulación de la presentación antigénica a distancia, ya que se ha observado que la mayoría de los exosomas circulantes en individuos sanos podrían provenir de linfocitos B y la mayoría de los exosomas que ingresan a la circulación linfática son rápidamente captados por células presentes en órganos linfoides secundarios (Hood, 2016).

Los exosomas también han sido relacionados con procesos fisiológicos en los cuales existe intervención activa del sistema inmune como el embarazo (Sabapatha, 2006), los fenómenos de reparación (Luga, 2012) y diferenciación celular o el desarrollo de células madre hemopoyéticas (Kim, 2017).

Así como los exosomas son producidos en su mayoría por células del sistema inmune, se relacionan con estados patológicos en los cuales el sistema inmune o la inflamación juegan un rol de importancia como es el cáncer, las infecciones virales o parasitarias o las enfermedades neurodegenerativas (Malm, 2016).

El papel de los exosomas en cáncer ha sido intensamente estudiado. Una vez liberados al exterior y a la circulación estas MVs interactúan a través de las moléculas de membrana con receptores en

las células blanco y a través de diversos mecanismos transfieren le su contenido de proteínas y ácidos nucleicos. Como resultado se produce la reprogramación de la célula receptora y se modifica su actividad (Szajnik, 2010).

Los exosomas derivados de tumores (TEX) pueden favorecer el desarrollo de metástasis a través de diversos mecanismos. Algunos afectan el microambiente tumoral e involucran cambios en el metabolismo de las células blanco o inducción de la angiogénesis (Skog, 2008). También pueden afectar a otras células tumorales ya que se ha observado transferencia de capacidades metastáticas a células que no las poseen.

Uno de los ejemplos mejor estudiados es la relación de exosomas derivados de células de melanoma con la generación de nichos pre-metastáticos en la médula ósea o ganglios linfáticos de ratones (Hood, 2011). En este modelo, la administración de exosomas aislados de células de melanoma permite el establecimiento de metástasis de células de melanoma en aquellos tejidos que previamente fueron expuestos a los exosomas. Posteriormente se describieron varios modelos similares de generación de nichos pre-metastáticos. En el hígado, los exosomas de cáncer de páncreas transportan MIF, una citoquina que induce la expresión de TGF β en las células de Kupffer y reclutamiento de células inmunes. En los pulmones, exosomas derivados de tumores renales inducen angiogénesis mediante una colección de miRNAs y mRNA o exosomas de cáncer de páncreas transportan HGF, el cual activa fibroblastos y células inflamatorias (Zhao, 2018).

Una observación que refuerza la importancia de los TEX en el proceso de metástasis es la capacidad de reconocer sus células blanco. Este rasgo “organotípico” de los TEX se relaciona con la presencia de diferentes variedades de integrinas en la superficie de exosomas provenientes de distintos tumores (Hoshino, 2015).

Por otra parte, los TEX poseen diversas moléculas que producen modulación de la actividad del sistema inmune. En su superficie han

sido detectados PDL1, FASL, CD73, TGF β o Glipican1 y se ha demostrado su capacidad para modular la respuesta de células del sistema inmune, en particular los linfocitos T (Hoshino, 2015).

Los mecanismos por los cuales se inducen cambios en las células del sistema inmune difieren según el tipo de célula receptora. Mientras que monocitos, linfocitos B y células NK internalizan rápidamente TEX, los linfocitos no lo hacen (entre ellos los linfocitos T reguladores [Treg]). En este tipo de células se establece algún tipo de activación de receptor que produce señalización intracelular, con aumento de calcio citosólico y consumo de ATP. En el caso de los linfocitos T CD4+, el efecto de los TEX promueve una disminución de la expresión de la cadena zeta del TCR y modula la actividad de las proteínas JAK y STAT, las cuales son fundamentales para la señalización de receptores de citoquinas. Por otra parte, los linfocitos T CD8+ resultaron sensibles a la presencia de las moléculas inmunomoduladores presentes en los TEX, las cuales inducen la apoptosis de estas células. Resulta interesante que, mientras los TEX pueden disminuir la actividad de los CD4+ y apoptosis en CD8+, pueden aumentar la actividad supresora de los Treg (Hoshino, 2015).

Son estas dos características, la capacidad de favorecer las metástasis y la capacidad de evadir la respuesta inmune, sumadas a la gran estabilidad que poseen en la circulación sanguínea, lo que determinan el gran potencial que poseen los exosomas como marcadores biológicos del cáncer.

Objetivos

Los objetivos que se plantearon en nuestro Centro de investigaciones fueron, en primer lugar, generar la capacidad de aislar y caracterizar MVs y exosomas de diversas fuentes, tanto en modelos in vitro como de líquidos biológicos obtenidos de pacientes portadores de neoplasias malignas. En segundo lugar, relacionar los TEX con la presencia

de moléculas involucradas en mecanismos de inmunoevasión. Finalmente, evaluar la presencia de moléculas de adhesión que pudieran determinar la existencia de “blancos celulares” para los TEX.

En tal sentido se propuso evaluar la presencia en TEX de la enzima Indoleamino 2,3-Dioxigenasa 1 (IDO), involucrada en la degradación del aminoácido esencial triptófano y en la producción de metabolitos como las quinureninas. La expresión de IDO en células dendríticas, monocitos y macrófagos les permite modular la actividad de las células T cercanas al variar las concentraciones de triptófano y sus metabolitos. De esta manera, IDO contribuye con el mantenimiento de la tolerancia periférica, pero favorece mecanismos de evasión de la respuesta antitumoral.

Por otra parte, en una gran proporción de tumores es posible observar alteraciones tempranas en la glicosilación de sus proteínas. Una de las consecuencias de estas alteraciones es la expresión de antígenos crípticos como el antígeno Tn. Este antígeno es el resultado de la unión de N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a los aminoácidos Treonina o Serina, siendo el primer monosacárido de las cadenas de O-glicosilación de proteínas. Al alterarse la actividad de las subsiguientes glicosiltransferasas, responsables de la elongación de las cadenas de O-glicanos, Tn queda expuesto.

Recientemente se ha descrito que Tn puede generar enlaces hemofílicos entre proteínas que expresen este antígeno, así como la presencia de un receptor específico denominado MGL en la superficie de macrófagos ganglionares.

Metodología

La obtención de MVs y exosomas a partir de líneas celulares tumorales en cultivo se realizó mediante el siguiente protocolo (figura 2). Las distintas líneas fueron cultivadas en frascos T75 y luego repicadas en frascos T175 donde se les permitió crecer hasta sub-

confluencia (70% de la superficie ocupada), empleando medios de cultivo y técnicas de repique estándares. Luego las células fueron lavadas tres veces con solución de Hank estéril y cultivadas con medio libre de suero fetal bovino y suplementado con aditivos según el tipo celular en cuestión. Luego de un período de cosecha de 48 a 72 horas, el medio condicionado fue removido y se repitió el esquema de repiques hasta tres veces por frasco.

El medio condicionado fue centrifugado a 400xg y 1.500xg durante 30 minutos cada vez, a 4°C, descartando los pellets. Luego el sobrenadante fue centrifugado a 15.000xg durante 30 minutos a 4°C, obteniendo un pellet de MVs grandes, el cual fue alicuotado y almacenado a -70°C. El sobrenadante fue centrifugado a 100.000 xg durante 70 minutos a 4°C y el pellet obtenido fue nuevamente centrifugado a 100.000 xg durante 70 minutos a 4°C. Este último pellet fue alicuotado y almacenado a -70°C como “Exosomas o EXO”

A partir de sangre periférica obtenida por punción venosa y, con el agregado de EDTA en exceso, se obtuvo plasma humano de pacientes con cáncer, centrifugando la sangre a 400xg durante 15 minutos a TA. El plasma fue nuevamente centrifugado a 1.500xg durante 30 minutos, a 4°C, descartando el pellet. Luego se centrifugó a 15.000xg durante 30 minutos a 4°C, obteniendo un pellet de MVs grandes, el cual fue alicuotado y almacenado a -70°C. El sobrenadante fue sometido a cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) en columnas de sefarosa CL2B. Las fracciones correspondientes al volumen muerto (MW cutoff >1M Dalton) fueron evaluadas mediante espectrofotometría a 260, 280 y 330 nm, con el fin de aislar los picos correspondientes a las fracciones abundantes en absorbancias a 330 nm y en la relación 280/260 nm (indicativo de partículas y presencia de ácidos nucleicos; figura 2).

Eventualmente, algunas muestras fueron sometidas a centrifugación en gradientes de sacarosa (densidad 1 – 1,2 – 1,4 g/l) y centrifugadas a 100.000xg durante 120 minutos a 4°C con el fin de aislar

microvesículas con densidades de 1,18 g/l, las cuales fueron lavadas y centrifugadas a 100.000xg durante 70 minutos a 4°C.

Las fracciones que contienen MVs grandes y exosomas fueron evaluadas mediante Dot Blot, colocando 5uL de muestra sobre nitrocelulosa y bloqueando el papel con leche en polvo descremada 5% en PBST. Luego las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra CD9 o CD63 y con anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa. Finalmente, la reacción fue revelada mediante la técnica de quimioluminiscencia sobre placas radiográficas. Aquellas fracciones que demostraron la presencia de marcadores de exosomas fueron evaluadas mediante Western blot con anticuerpos anti-IDO y anti-Tn.

Además, 5 uL de cada fracción fue fijada mediante 5 uL de glutaraldehído 5% en PBS y analizadas mediante microscopía electrónica. Las muestras se colocaron en rejillas de cobre e incubaron durante 5 minutos. Se tiñó con ácido fosfotúngstico al 2% durante 40 segundos y se observó y documentó con un microscopio electrónico JEM 1200 EXII (JEOL).

Las muestras también fueron analizadas para determinar su contenido de proteínas mediante fluorimetría (Qubit, Thermo forma) y tinción con plata de SDS-PAGE.

Resultados

Se analizaron muestras a partir de 27 pacientes portadoras de carcinomas de mama en diversos estadios y se incluyeron 4 muestras de control obtenidas de pacientes sanas. Se observó la presencia de señales elevadas mediante espectrofotometría en XX muestras y los valores de concentración de proteínas, expresadas en ug en fracción por mL de plasma fueron 7,86 ug/mL.

La observación mediante microscopía electrónica permitió la observación de estructuras vesiculares de tamaño y formas similares a exosomas, algunas de ellas agregadas en racimos o en solitario (figura 3). En general las imágenes muestran la acumulación de tinción en la

cercanía de las vesículas, probablemente por la afinidad del ácido fosfotúngstico por estructuras con carga eléctrica como glicoproteínas.

El análisis mediante SDS-PAGE y tinción con plata demostró la presencia de diversas proteínas y glicoproteínas de alto peso molecular en las fracciones correspondientes a las MVs de tipo exosomas (figura 3). La evaluación mediante dot blot demostró que 16/27 fracciones fueron positivas para marcadores de exosomas y la evaluación posterior demostró la presencia deIDO, en 9/25 pacientes. De igual manera se detectó la presencia de Tn en 7/27 muestras y se observaron mediante Western Blot diversas bandas de varios pesos moleculares, algunas de altos pesos moleculares, correspondientes a potenciales proteínas portadoras de Tn.

Conclusiones

Nuestras investigaciones han permitido establecer una metodología confiable y efectiva para el aislamiento de MVs y exosomas a partir de pacientes con cáncer como de líneas celulares tumorales en cultivo. En ambos casos se observó la presencia de MVs de tamaño y formas compatibles con exosomas, es decir, estructuras vesiculares de entre 50 y 200 nm con tendencia a formar agregados. En los casos en que las muestras fueron ultracentrifugadas fue posible observar la característica deformación en forma de cuenco, resultado de la fuerza aplicada sobre las vesículas. También fue posible detectar la presencia de marcadores propios de la vía endosomal como CD63 o CD9. Estas tetraspaninas se encuentran involucradas en el transporte y biogénesis de los exosomas y representan a las proteínas más confiables para la determinación de la presencia de estas MVs. Estos resultados sugieren que las fracciones obtenidas poseen exosomas en abundancia, aunque no es posible descartar la presencia de otras partículas o agregados proteicos que contaminen las muestras, estas observaciones coinciden con las realizadas por otros grupos de investigación

y las recomendaciones internacionales recientemente realizadas respecto del estudio de MVs (Lotvall, 2014).

La presencia de la enzima IDO en las fracciones que poseen TEX resulta de sumo interés. La enzima IDO representa un mecanismo de regulación del sistema inmune empleada por los tumores para evadir las respuestas antitumorales. La presencia de IDO en exosomas permitiría extender su efecto sobre las concentraciones de triptófano y sus metabolitos más allá del microambiente tumoral en el cual se genera (Isla Larrain, 2014). En futuras investigaciones sería interesante determinar si la presencia de TEXs IDO+ es capaz de modular la actividad linfocitaria.

La detección de una proporción importante de fracciones de TEX que contienen el antígeno Tn, en gran parte de las veces coincidente con la expresión de Tn en el tumor primario, sugiere que estas MVs son efectivamente derivadas del tumor.

La lectina MGL es el ligando natural de Tn; es expresada principalmente por células dendríticas y macrófagos del seno subcapsular de los ganglios linfáticos, en general asociados con un fenotipo supresor (Van Vliet, 2018). Por otra parte, se ha sugerido que MGL actúa como receptor de GalNAc presente en filovirus y en el parásito *S. mansoni* y también como receptor de moléculas propias como la Mucina 1 (MUC1). En estos casos se ha determinado que MGL interviene en el reconocimiento de patrones asociados a patógenos y en la presentación antigénica de las moléculas portadoras de GalNAc (Napoletano, 2007). Por lo tanto, no resulta evidente el rol de la interacción Tn-MGL en cuanto a si suprime o estimula respuestas inmunes. El resultado de esta interacción dependerá en mayor medida del contexto en el cual se produce. Futuras investigaciones permitirán establecer si la presencia de Tn en TEX modula la actividad de las células presentadoras de antígenos que expresan MGL.

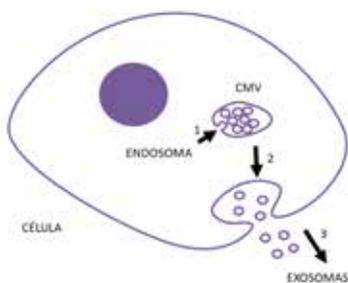
Bibliografía

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144, 646–674.
2. Prat, A. & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5, 5–23.
3. Braakhuis, B. J. M., Leemans, C. R. & Brakenhoff, R. H. (2004). A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J. Oral Pathol. Med.* 33, 317–22.
4. Brücher, B. L. D. M. & Jamall, I. S. (2016). Somatic mutation theory - Why it's wrong for most cancers. *Cell. Physiol. Biochem.* 38, 1663–1680.
5. Burt, R. W. & Rowley, P. T. (2005). Inherited Susceptibility to Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Med.* 56, 539–554.
6. Tomasetti, C., Li, L. & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. (80). 355, 1330–1334.
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57–70.
8. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–89.
9. Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383.
10. Tkach, M. & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 164, 1226–1232.
11. Armstrong, D. & Wildman, D. E. (2018). Extracellular Vesicles and the Promise of Continuous Liquid Biopsies. *J. Pathol. Transl. Med.* 1–8.
12. Lindenbergh, M. F. S. & Stoorvogel, W. (2018). Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 435–459.

13. Hood, J. L. (2016). The association of exosomes with lymph nodes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10. doi:10.1016/j.semcdb.2016.12.002
14. Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C. & Taylor, D. D. (2006). Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am. J. Reprod. Immunol.* 56, 345–55.
15. Luga, V. et al. (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.* 151, 1542–56.
16. Kim, Y. et al. (2017). Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.056
17. Nolte-t Hoen, E., Cremer, T., Gallo, R. C. & Margolis, L. B. (2016). Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9155–61.
18. Buck, A. H. et al. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.* 5, 5488.
19. Malm, T., Loppi, S. & Kanninen, K. M. (2016). Exosomes in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 97, 193–199.
20. Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M. J., Mandapathil, M. & Whiteside, T. L. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One.* 5, e11469.
21. Skog, J. et al. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–6.
22. Hood, J. L., San, R. S., Wickline, S. a., San Roman, S. & Wickline, S. a. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 71, 3792–3801.
23. Zhao, H. et al. (2018). The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *BBA - Rev. Cancer.* 1869, 64–77.

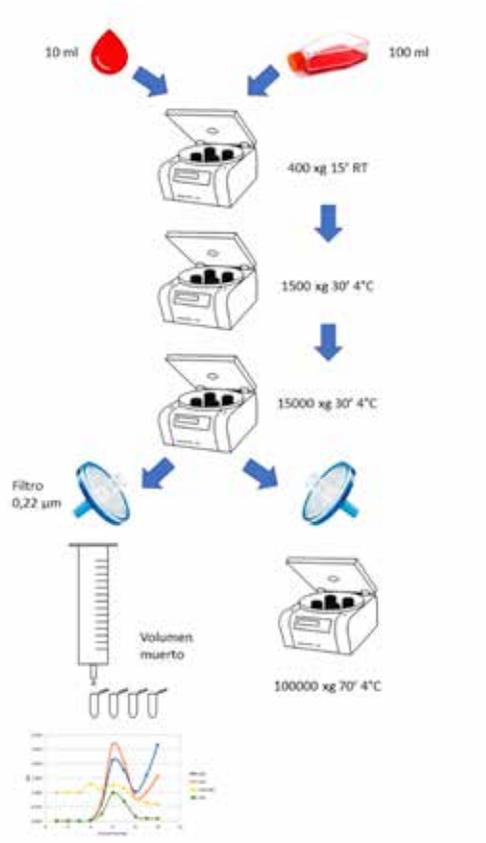
24. Hoshino, A. et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 527, 329–35.
25. Whiteside, T. L. (2017). Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer. *Clin. Exp. Immunol.* doi:10.1111/cei.12974
26. Lötvall, J. et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 3, 26913.
27. Isla Larrain, M. T. et al. (2014). IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. *Tumour Biol*. 35, 6511–6519.
28. van Vliet, S. J., Saeland, E. & van Kooyk, Y. (2008). Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunol*. 29, 83–90.
29. Napoletano, C. et al. (2007). Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells. *Cancer Res*. 67, 8358–8367.

Figuras

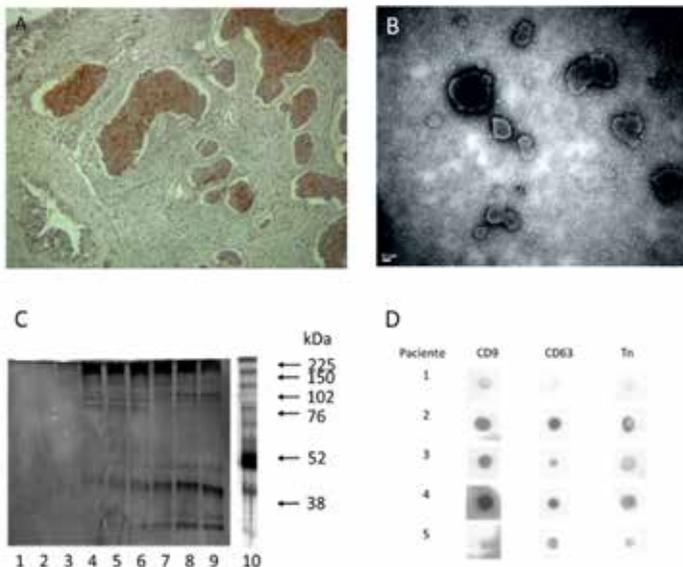


1. Esquema que detalla la génesis de exosomas a partir del compartimento endosomal por gemación hacia el interior de los cuerpos multivesiculares

(CMV). A continuación, la fusión de la membrana limitante con la membrana plasmática, permite la liberación del contenido de exosoma al exterior de la célula.



2. Resumen de los pasos empleados en el aislamiento de exosomas a partir de plasma humano o sobrenadantes de cultivo de células. Para más detalles ver el texto principal.



3. Resultados obtenidos del análisis de la expresión de Tn en pacientes con cáncer de mama. A) Inmunohistoquímica que demuestra expresión de Tn en tumores primarios, se observa reacción intensa en la gran mayoría de las células tumorales. B) Microscopía electrónica de una fracción obtenida por cromatografía de exclusión de tamaño a partir de plasma, se observa la presencia de vesículas de entre 50 y 200 nm compatibles con exosomas. C) Análisis por SDS PAGE y tinción con plata de las fracciones 1 a 9 obtenidas por cromatografía de exclusión de tamaño de plasma humano. En esta muestra, las fracciones 4 a 7 poseen la mayor absorbancia a 330, 280 y 260 nm, observándose predominio de bandas de alto peso molecular. D) Análisis mediante dot blot de fracciones positivas para marcadores CD63, CD9 y Tn; se muestran cinco ejemplos obtenidos por cromatografía de exclusión de tamaño del plasma de pacientes.

Función de GPAT2 en espermatogénesis y cáncer

Gonzalez Baro, M.R.

Resumen

Las glicerol-3-fosfato aciltransferasas son una familia de cuatro enzimas de membrana que catalizan el primer paso y limitante en la síntesis de glicerolípidos. El objetivo general de nuestro grupo de trabajo es identificar las funciones específicas de cada una de las isoformas en el metabolismo celular. Hipotetizamos que la isoforma GPAT2 no cumpliría un rol clásico de aciltransferasa sintetizadora de lípidos ya que se expresa en órganos no lipogénicos: testículos en condiciones fisiológicas y en algunos tipos de células cancerosas en condiciones patológicas. En células en cultivo demostramos que la sobreexpresión de GPAT2 aumenta la incorporación de ácido araquidónico en triacilgliceroles y que al silenciar GPAT2 en células de linaje tumoral (MDA-MB-231) éstas pierden su capacidad tumorigénica. El silenciamiento de GPAT2 también conduce a cambios en las propiedades de membrana plasmática y en la dinámica mitocondrial. Estudios realizados utilizando tejidos derivados de cánceres de mama humanos demostraron que la expresión de GPAT2 correlaciona con un mayor grado histológico de los tumores, reforzando la idea de la

relación directa entre GPAT2 y tumorigénesis. Al silenciar GPAT2 in vivo en testículos de ratón, la espermatogénesis se arrestó en el estadio paquiteno, y se activaron genes pro-apoptóticos, demostrando la esencialidad de su expresión para una correcta espermatogénesis. Concluimos que la función biológica de GPAT2 es muy diferente a las de las isoformas 1,3 y 4.

Palabras Clave:

Acido araquidónico, tumorigénesis, meiosis, membrana plasmática, mitocondria.

Introducción

El grupo de enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPAT) catalizan el primer paso y limitante en la síntesis celular de glicerolípidos, que es la acilación del glicerol-3-fosfato a partir de un sustrato acil-CoA (Fig. 1).

Es ácido lisofosfatídico es luego acilado en el carbono 2 del glicerol, y es sustrato tanto para la síntesis de triacilgliceroles (TAG) como de glicerofosfolípidos (PL).

En células de mamífero se han descrito 4 isoformas diferentes de esta enzima, todas ellas proteínas intrínsecas de membrana y producto de genes diferentes (González-Baro, 2007). Las isoformas 1 y 2 se localizan en la membrana mitocondrial externa mientras que GPAT3 y GPAT4 lo hacen en el retículo endoplásmico. La primera isoforma en ser clonada y caracterizada funcionalmente fue GPAT1 y se comprobó que su expresión es máxima en órganos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo, su expresión está regulada por el estado nutricional del organismo e incorpora activamente ácidos grasos a TAG.

GPAT2 comparte un alto grado de homología de secuencia y conformación con GPAT1, sin embargo, su expresión es casi nula en órganos lipogénicos y se expresa principalmente en testículos, no está regulada por el estado nutricional del animal (Wang y otros, 2007) y también demostramos su expresión en ciertas células tumorales.

El objetivo general de nuestro grupo de trabajo es identificar los roles específicos de cada una de las isoformas de GPAT en el metabolismo celular; y nos planteamos como objetivos específicos:

- 1.- Determinar la función de GPAT2 en la síntesis de lípidos celulares
- 2.- Estudiar la expresión y función de GPAT2 en testículos durante la maduración sexual de rata y ratón
- 3.- Determinar la expresión y función de GPAT2 en células tumorales.

Hipótesis de trabajo: Basándonos en el alto grado de homología con GPAT1, propusimos que GPAT2 contribuye a la síntesis de triglicéridos celulares, especialmente en testículo y células tumorales.

Metodología:

Para probar nuestra hipótesis, utilizamos como modelos experimentales tanto células en cultivo como modelos animales de rata y ratón (protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP; Número T10-02-2013).

Cultivos celulares: Se utilizaron las líneas celulares establecidas CHO-K1, Cos-7 y HEK-293 para los estudios de sobreexpresión de GPAT2 murina y humana. Las construcciones de cDNA fueron transfectadas mediante liposomas catiónicos. La sobreexpresión fue corroborada mediante qPCR y western-blot (Wang y otros, 2007) (Cattaneo y otros, 2012).

La línea celular derivada de cáncer de mama MDA-MB-231, caracterizada por su expresión intrínseca de GPAT2 humana, fue utilizada para silenciar GPAT2 mediante un sistema de RNA de interferencia *small-hairpin RNA* (shRNA, Origene), utilizándose como control una RNA *scramble* que no silencia ningún gen conocido (SCR-RNA).

Los modelos celulares de sobreexpresión y subexpresión de GPAT2 fueron analizados para determinar la actividad GPAT y acilglicerolfosfato aciltransferasa (AGPAT) con glicerol-3-fosfato y acilglicerolfosfato radiactivos, la composición de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido, marcado metabólico con ácido araquidónico radiactivo, proliferación celular mediante ensayos de MTT, crecimiento independiente de anclaje por ensayos en agar blando, migración celular por velocidad de cerrado de herida y apoptosis por la técnica de TUNEL (Cattaneo y otros, 2012).

Estudios *in vivo*: la expresión de GPAT2 en testículo de rata y ratón fue estudiada, a nivel de mRNA, por las técnicas de Northern-blot, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) e hibridación *in situ*. A nivel de proteína se determinó mediante Western-blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Mediante la inyección de un shRNA específico para GPAT2 de ratón vehiculizado por lentivirus se realizó el silenciamiento *in vivo* en testículos de ratón. La inyección de los virus fue intratesticular (García-Fabiani y otros, 2017).

Resultados

La sobreexpresión de GPAT2 incrementa el tamaño de las gotas de lípido en células CHO-K1

El cDNA que codifica para GPAT2 murina subclonado en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 fue transfectado en células

CHO-K1. Como control negativo se transfectó el plásmido vacío y como control positivo el gen de GPAT1 (Fig. 2).

Demostramos que tanto la sobreexpresión de GPAT1 como la de GPAT2 incrementan significativamente el tamaño de las gotas de lípido intracelulares, visualizadas por tinción con Oil-Red-O, demostrando una mayor acumulación de TAG.

Para comprobar si el aumento en los TAG es consecuencia del incremento en la actividad GPAT, medimos la actividad utilizando distintos acil-CoA como sustrato (Fig. 3A). Pudimos observar en células que sobreexpresan GPAT2 un aumento en la actividad solamente cuando se utilizó araquidonil-CoA (20:4-CoA) como sustrato, ácido graso poco frecuente en la fracción TAG. Al analizar los productos de reacción, comprobamos que al sobreexpresar GPAT2 no se observa marca en el ácido lisofosfatídico (LPA), producto de la acción de esta enzima (Fig.1), mientras que sí se observa con GPAT1. Solo con 20:4-CoA se observa marca en ácido lisofosfatídico (PA, Fig. 3B). Ese resultado es coherente con el aumento de actividad acilglicerolfosfato aciltransferasa que observamos al expresar GPAT2 (Fig. 3C). Cuando incubamos a la células en presencia de ácido araquidónico marcado, vimos que la marca aumentó sólo en la fracción TAG (Fig. 3D) y, concomitantemente, observamos presencia de ácido araquidónico en la fracción TAG solamente en la células que sobreexpresan GPAT2 (Fig. 2E).

GPAT2 se expresa en células de la línea espermática y su expresión varía durante el desarrollo sexual.

Con el objetivo de definir qué tipo/s celular/es testiculares expresan GPAT2 en rata adulta, realizamos el análisis de la expresión del mRNA por hibridización in situ y de la proteína por inmunofluorescencia (Fig.4). Pudimos observar que el mRNA se expresa exclusivamente en los espermatocitos primarios mientras que la proteína

(señal verde) se puede visualizar también en estados más avanzados de la espermatogénesis.

Durante el desarrollo sexual de rata, analizando la expresión de mRNA tanto por Northern-blot como por qPCR demostramos que es máxima a los 30dpp (días después del parto), edad que coincide con la primer ola espermatogénica en la cual en los túbulos seminíferos se encuentran principalmente espermatoцитos primarios (Fig.5). La proteína también mostró su máxima expresión en esta edad.

Durante el desarrollo sexual de ratones, también observamos que tanto el mRNA como la proteína de GPAT2 se expresan en estadios juveniles (Fig. 6)

La expresión de GPAT2 es esencial para el proceso de meiosis

Para determinar la función de GPAT2 en los testículos silenciados la expresión del gen in vivo mediante la inyección de un shRNA específico para GPAT2(sh-Gpat2) y su control SCR. Observamos que los túbulos seminíferos expuestos a SCR presentan una histología normal, mientras que en los expuestos a sh-Gpat2 no se observan células más allá del estadio paquiteno (Fig. 7). El estadio paquiteno fue comprobado mediante el análisis de genes marcadores para cada etapa de la meiosis. También observamos que al silenciar GPAT2 se activa la expresión de genes pro-apoptóticos. Sin embargo, no se observaron diferencias en el contenido de TAG de testículos control y silenciados.

GPAT2 se expresa en tejido canceroso y su expresión favorece el fenotipo tumoral

Analizamos la expresión de GPAT2 en un microarreglo de tejidos de adenocarcinomas mamarios (Origene) por inmunohistoquímica y observamos que en el tejido normal no se expresó GPAT2, solo se detectó la proteína en el 37% de los adenocarcinomas. En ellos, fue mayor la expresión en los cánceres con mayor grado histológico (Fig. 8). Eso nos hizo pensar que GPAT2 podría estar involucrada en el

proceso de carcinogénesis. Para ello, silenciamos GPAT2 en células derivadas de cáncer de mama MDA-MB-231, y pudimos comprobar que la subexpresión de GPAT2 atenúa las características tumorales de este tipo celular: disminuye la proliferación celular, pierden la capacidad de crecer sin anclaje, disminuye la migración celular, aumenta la sensibilidad de las células a la droga pro-apoptóticastaurosporina y pierden su capacidad tumorigénica in vivo (Fig. 9).

La expresión de GPAT2 altera la membrana plasmática, mitocondrias, citoesqueleto y vías de señalización

Durante la caracterización de nuestros modelos de silenciamiento de GPAT2 en líneas celulares humanas pudimos observar diferencias en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos totales (medidas realizadas por cromatografía gas-líquido), y cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (medida de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo). Estos resultados nos llevaron a realizar un estudio más detallado de las consecuencias del silenciamiento de GPAT2 sobre las propiedades de la membrana plasmática, y para esto utilizamos la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM). La AFM proporciona imágenes de alta resolución que permiten realizar un análisis detallado tanto de la superficie de la membrana celular como del entorno celular, proporcionando información a nivel nanométrico. En las células MDA-MB-231 las imágenes obtenidas por esta técnica nos permitieron observar una mayor rugosidad en las células scr-MDA y la presencia de poros en sh-MDA, resultado que correlaciona con las medidas de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa al medio de cultivo, que es 65% mayor en las células sh-MDA que en las scr-MDA (Fig. 9). El silenciamiento de GPAT2 en células MDA-MB 231 produce un cambio en el tamaño-disposición de las mitocondrias, probablemente inactivando la fusión mitocondrial, ya que se puede observar una marca de Mitotracker (sonda fluorescente que denota mitocondrias

activas) mucho más fuerte en las células scr-MDA que en las células sh-MDA procesadas simultáneamente.

Con el objetivo de conocer los mecanismos moleculares que conducen a un fenotipo protumorigénico que correlaciona positivamente a la expresión de GPAT2 con procesos de proliferación, apoptosis y migración en líneas celulares de cáncer humano, realizamos un estudio del perfil de expresión diferencial entre células tumorales que expresan GPAT2 y aquellas con la expresión de GPAT2 silenciada mediante un microarreglo de genes. Para ello se utilizaron las líneas celulares sh-MDA y scr-MDA, se extrajo el RNA de dichas células y se estudió la expresión diferencial del genoma humano. El análisis por microarreglo mostró un gran número de genes con expresión diferencial entre las líneas celulares utilizadas: se hallaron 736 genes diferencialmente expresados, pertenecientes a varias rutas metabólicas y procesos celulares. Estos genes pertenecen a vías de señalización, metabolismo del ácido araquidónico, regulación de la apoptosis, adhesión, migración y proliferación celular, expresión de RNAs no codificantes (regulatorios) e integridad del citoesqueleto. Es en estos temas que estamos trabajando actualmente.

Conclusión:

Hasta el momento, hemos demostrado que GPAT2 no es una aciltransferasa con la función clásica de iniciar la síntesis de glicerolípidos. Específicamente, probamos que:

Se expresa en testículo y cáncer.

No está regulada por Insulina, si por la metilacion del DNA.

Incorpora ácido araquidónico.

EN CÁNCER:

Su expresión promueve el fenotipo tumoral y la integridad de la Membrana Plasmática

Altera el citoesqueleto y las mitocondrias.

EN TESTÍCULO:

Es esencial para la meiosis

Regula la expresión de genes apoptóticos.

Síntesis de RNA regulatorios (piRNA).

Por lo tanto, nuestra hipótesis inicial de trabajo fue alterada significativamente, y basándonos en nuestros resultados previos nuestra hipótesis actual plantea que:

GPAT2 contribuye al fenotipo tumoral y a la progresión de la meiosis formando parte de vías de señalización celular, regulando RNAs no codificantes y/o modificando estructuras celulares como mitocondrias, citoesqueleto y membrana plasmática.

Concluimos que aunque dos proteínas tengan una secuencia, conformación y localización celular similares no implica que su función biológica sea parecida.

Bibliografía

1. Gonzalez-Baro, M. R., Lewin, T. M. and Coleman, R. A (2007). Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 292, G1195-G1199.
2. Wang, S., Lee, D. P., Gong, N. y otros (2007). Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch. Biochem. Biophys.* 465, 347-358.
3. Cattaneo, E. R., Pellon-Maison, M., Rabassa, M. y otros. (2012). Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 is expressed in spermatid germ cells and incorporates arachidonic Acid into triacylglycerols. *PLoS. One.* 7, e42986.
4. Pellon-Maison, M., Montanaro, M. A., Lacunza y otros (2014). Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 behaves as a cancer testis

gene and promotes growth and tumorigenicity in the breast cancer MDA-MB-231 cell line. PLoS. One. 9, e100896.

5. Garcia-Fabiani, M. B., Montanaro, M. A., Lacunza y otros (2015). Methylation of the Gpat2 promoter regulates transient expression during mouse spermatogenesis. Biochem. J. 471, 211-220.

6. Garcia-Fabiani, M. B., Montanaro, M. A., Stringa, P. y otros (2017). Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 is essential for normal spermatogenesis. Biochem. J. 474, 3093-3107.

Leyenda de las figuras

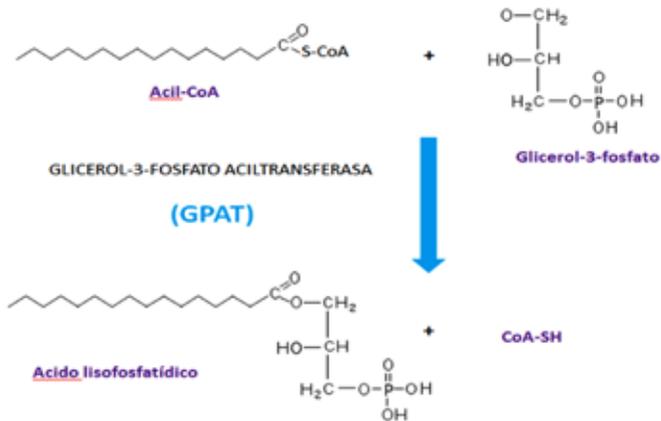


Figura 1: Reacción catalizada por la enzima Glicerol-3-fosfato aciltransferasa.

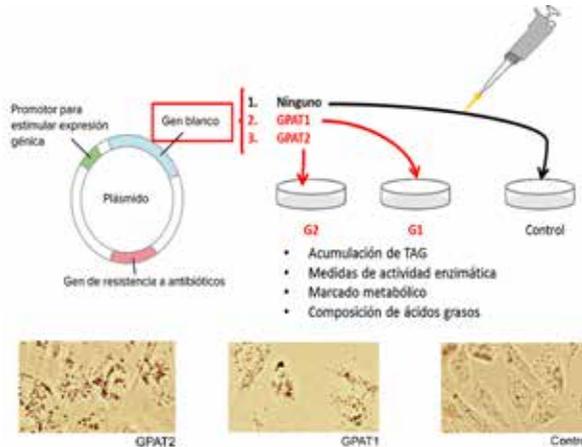


Figura 2: Sobreexpresión de GPAT2 de ratón en células en cultivo. La sobreexpresión de GPAT2 incrementa el tamaño de las gotas de lípido.

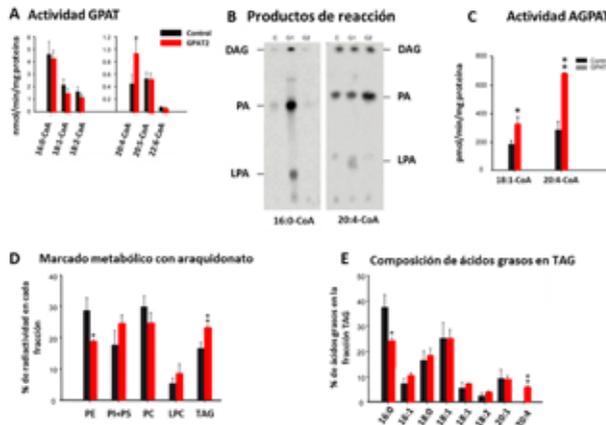


Figura 3: la sobreexpresión de GPAT2 dirige la incorporación de ácido araquidónico en triacilglicérol.

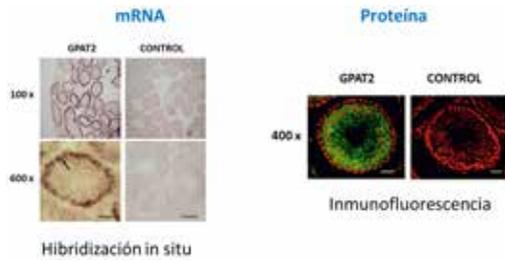


Figura 4: GPAT2 se expresa en la línea espermática de rata.

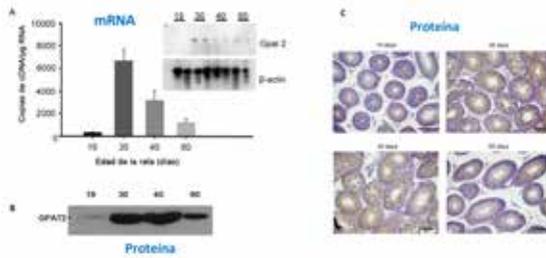


Figura 5: La expresión de GPAT2 es máxima en testículos de ratas juveniles.

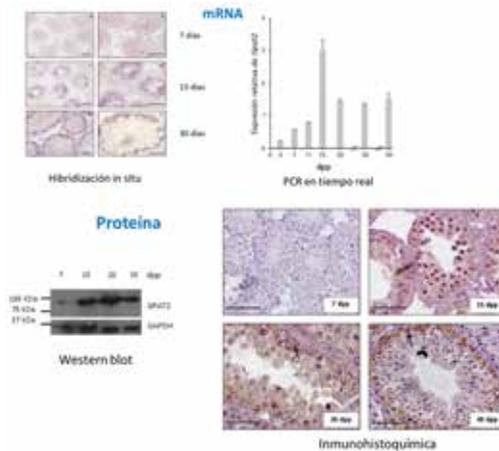


Figura 6: La expresión de GPAT2 es máxima en testículos de ratones juveniles.

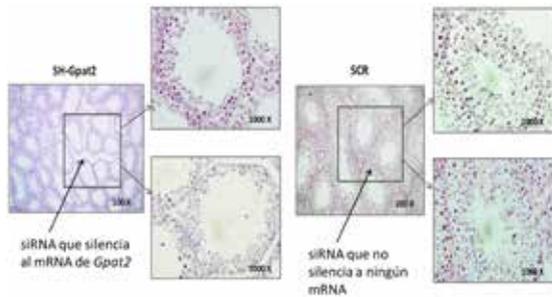


Figura 7: El silenciamiento de GPAT2 detiene la meiosis en el estadio paquitenio.

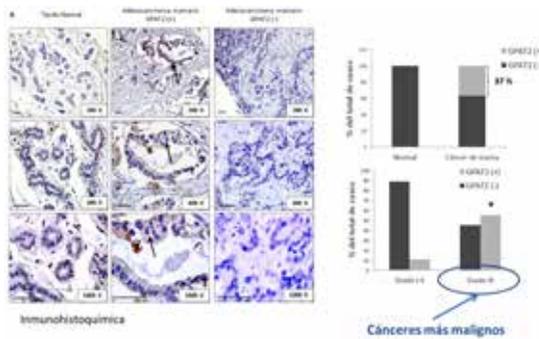


Figura 8: GPAT2 se expresa en tejido canceroso.

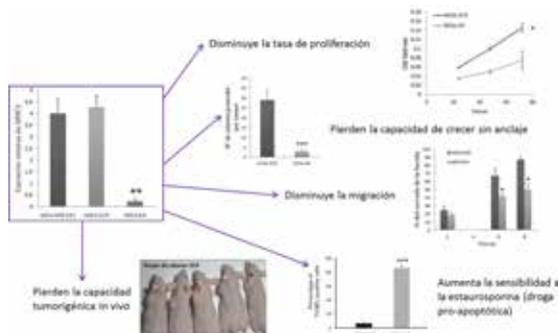


Figura 9: Al silenciar GPAT2 las células derivadas de cáncer de mama MDA-MB-231 pierden su capacidad tumorigénica.

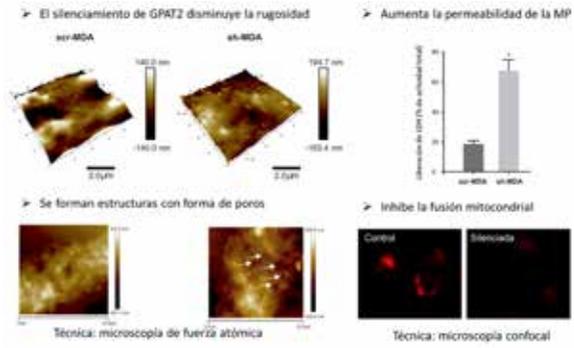


Figura 10: La expresión de GPAT2 altera la membrana plasmática y mitocondrias.

Prevención de tabaquismo adolescente

Análisis de un estudio cuasi-experimental antes-después controlado

Pablo Elías Gulayin

Introducción

El tabaquismo es uno de los principales problemas de salud pública siendo considerado la primera causa de muerte prevenible (OMS, 2008) (Rubistein y otros, 2010). A nivel global, el consumo de tabaco se estima que ocasiona 5,1 millones de muertes por año (OMS, 2009). La mayoría de estas muertes ocurrirán en países en vías de desarrollo, donde se ha registrado un aumento del consumo, especialmente en los grupos más vulnerables (Bardach y otros, 2016), los jóvenes y las mujeres.

Los daños a la salud causados por el consumo de tabaco se inician desde el consumo en la adolescencia, habiéndose observado que el 88% de los fumadores adultos iniciaron a fumar antes de los 18 años (Colombo y otros, 2005). La última Encuesta Mundial de Salud Escolar del Ministerio de Salud de la Nación en Argentina, realizada sobre estudiantes del nivel secundario, mostró alta proporción jóvenes que han experimentado con el tabaco, elevada exposición al humo ajeno, baja capacitación sobre los efectos nocivos del tabaco y susceptibilidad para iniciar a fumar entre los no fumadores.

Varios puntos de la Ley Nacional 26.687 y del plan MPOWER de la OMS1 sobre la regulación de la publicidad, promoción y consumo de los productos elaborados con tabaco apuntan a prevenir el tabaquismo en los jóvenes. Si bien se han reportado avances positivos en la implementación de la ley, existe una brecha importante con el desarrollo de estudios y trabajos de campo vinculados a la prevención de tabaquismo en jóvenes. La información acerca de la efectividad de las intervenciones en prevención primordial de tabaquismo en edades tempranas, en general muestra resultados positivos, a pesar de la heterogeneidad en la metodología utilizada y controversia acerca de la sustentabilidad de los cambios generados (Fernández, 2002) (Villabí, 1992). Se ha estimado a través de modelos de simulación, cómo la restricción de la edad de inicio del consumo en jóvenes ayudaría a reducir la proporción de tabaquismo en adultos (Borracci, 2015).

Hipótesis de trabajo:

Una intervención educativa en adolescentes puede disminuir la prevalencia de tabaquismo.

Objetivos del estudio

- Evaluar el impacto de una intervención educativa dirigida a jóvenes de nivel secundario de la ciudad de La Plata para prevenir el inicio del consumo tabáquico, en el contexto de la prevención primordial del tabaquismo.
- Identificar variables asociadas al consumo adolescente en la población estudiada

Materiales y métodos

Los detalles del estudio Adolescentes Libres de Tabaco (ALIT) fueron publicados previamente (Gulayin y otros, s/d). En resumen,

es un estudio antes/después controlado que utilizó una encuesta realizada en tres años consecutivos sobre la población estudiantil de dos colegios secundarios de la ciudad de La Plata. El diseño antes/después se encuentra entre los denominados diseños “cuasi-experimentales” (Manterola, s/d) y se caracteriza por la realización de una medición basal, seguida de la implementación de una intervención y de una nueva evaluación posterior a la intervención. Los estudios cuasi experimentales son sumamente útiles en el campo de la investigación en implementación en salud pública, dado que poseen la ventaja de ser más rápidos, más económicos (lo que los hace más factibles de implementarse exitosamente) y permiten fácilmente trabajar en condiciones naturales (Manterola, s/d). Las mediciones en el grupo control aportan la fortaleza de poder conocer las diferencias basales entre ambos grupos y evaluar los cambios seculares, permitiendo determinar variables externas que influyan sobre el efecto esperado por razones distintas a la intervención.

El estudio se implementó en dos colegios secundarios de la ciudad de La Plata, céntricos, públicos, mixtos y con modalidad de ingreso tipo sorteo. El colegio que recibió la intervención fue denominado como Colegio A (CA) y el colegio control Colegio B (CB). En septiembre de 2010 se realizó una encuesta basal a los alumnos de los colegios participantes. La misma se volvió a administrar en noviembre de 2011 y noviembre de 2012. El instrumento que se aplicó consistió en una encuesta estructurada, anónima, voluntaria y auto-administrada. Se consideró adolescentes fumadores actuales a aquellos estudiantes que reportaron fumar diariamente o fumar pero no todos los días. Para el análisis y seguimiento, se clasificó a los alumnos de acuerdo al curso en el que se encontraban en el año 2010: alumnos de 1er año (G 1), alumnos de 2º y 3er año (G 2) y alumnos de 4º y 5º año (G 3). Los mismos cursos del CB constituyeron el grupo control. Se incluyeron en el análisis final solo aquellos cursos que completaron el seguimiento.

La intervención educativa orientada a prevenir el inicio del tabaquismo se implementó sobre los alumnos de segundo y tercer año del CA luego de la encuesta basal en 2010. La intervención contempló las siguientes tres actividades: 1. dos charla-debates sobre los daños nocivos del tabaquismo, la visión del problema desde la salud pública y la actual legislación en la Argentina sobre el tema, 2. talleres en grupos reducidos donde los alumnos tuvieron que presentar afiches realizados por ellos mismos basados en las unidades temáticas y 3. exposición en el colegio de los trabajos finales realizados por los alumnos.

Para la comparación de las características basales de la población se utilizó el test exacto de Fisher para las variables categóricas y T-test para las variables continuas. Se construyó un modelo de regresión logística multivariable para las variables asociadas al consumo de cigarrillos en esta población. En cada uno de los puntos de seguimiento evaluados se realizó una comparación de las proporciones del punto final primario utilizando el test exacto de Fisher para establecer la significancia estadística. En todos los análisis realizados, se consideró como diferencia estadísticamente significativa aquellos valores de $p < 0,05$ a dos colas. Se utilizó el paquete estadístico Stata 13.0.

Resultados

Sobre la cantidad de alumnos matriculados al momento de la encuesta, la tasa de respuesta global a la misma fue del 88% en el colegio A y 77.5% en el colegio B. Se incluyeron en el análisis 1911 encuestas (617 del CA y 1294 del CB) de primero a quinto año. La Tabla 1 resume las características basales de la población de ambos colegios participantes.

Las variables incluidas en el modelo múltiple final como predictores de tabaquismo adolescente fueron: presencia de hermanos fumadores, madre fumadora, años de edad y sexo femenino. En la Tabla 2 se presentan los OR con sus respectivos IC 95%.

La tabla 3 presenta las prevalencias de tabaquismo por colegio y por grupo de seguimiento en ambos colegios. Solo se observó una diferencia significativa de la prevalencia de tabaquismo en el primer año luego de la intervención (CA: 4,6% vs CB: 11,4 p=0,005), desapareciendo dicha diferencia en el segundo año de seguimiento. En el análisis estratificado por sexo, la diferencia fue solo estadísticamente significativa entre las mujeres y solo en el primer año luego de la intervención (CA: 4,7% vs CB: 11,4 p=0,048).

Conclusiones

En la población estudiada, la tenencia de una madre o hermano fumador, los años de edad y el sexo femenino se correlacionó fuertemente con el consumo de cigarrillos. Como fue descrito en encuestas nacionales: se observó mayor consumo de cigarrillos en las mujeres, la mayoría de los estudiantes inició a fumar entre los 13 y 15 años y la mitad de los estudiantes reportó estar expuesto al humo en el hogar (Konfino y otros, 2012).

En lo que respecta al impacto de la intervención implementada en la prevalencia de tabaquismo en el grupo intervención directa, se observó una merma en el incremento natural de la prevalencia de tabaquismo en la primera encuesta tras la intervención aunque dicho efecto desapareció por completo en la tercera encuesta, 27 meses después. Esto quiere decir que, mientras que en el primer seguimiento existió una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de tabaquismo del 6,8%, esta brecha desapareció en el segundo seguimiento. Es interesante destacar que dicha tendencia fue estadísticamente significativa en el sexo femenino.

Se mencionan las siguientes limitaciones del presente trabajo: primero, esta muestra representa exclusivamente datos de dos colegios céntricos de la ciudad de La Plata con lo cual los resultados no son generalizables; segundo, al igual que las encuestas nacionales de

tabaco en jóvenes en Argentina, estos resultados solo aplican a los alumnos que se encontraban presentes el día de la encuesta; y tercero todos los datos surgen del auto-reporte por lo que puede existir infra o supra reporte sobre ciertos comportamientos de los jóvenes. Sin embargo, la confiabilidad de las encuestas sobre hábitos tabáquicos en jóvenes ha demostrado ser de las más altas entre las conductas de riesgos en jóvenes (Brener ND y otros, 2002).

Las causas por las que el efecto principal buscado (reducción significativa de la prevalencia de tabaquismo al final del seguimiento) pudo no haber sido permanente pueden ser: (I) duración insuficiente de la intervención: fue solamente implementada luego de la encuesta basal en el primer año del estudio. Esto podría sugerir que las intervenciones en prevención primordial deberían ser continuas o al menos tener en cuenta la aplicación de “dosis refuerzo”, al igual que posee el uso de las vacunas a nivel poblacional; (II) Intervención tardía: los estudiantes que recibieron la intervención en el año 2010 tenían 12 y 13 años y al culminar el seguimiento 14 y 15 años y (III) alta prevalencia de tabaquismo en el hogar: uno de los determinantes de inicio de tabaquismo adolescente.

El desafío desde la salud pública en la problemática del tabaquismo adolescente consiste en continuar desarrollando y fortaleciendo un entorno favorecedor para la cesación entre los jóvenes que permita también reducir la iniciación, incorporando estrategias novedosas y adaptadas a la realidad de los jóvenes. En lo que respecta al formato y componentes de la intervención educativa, se proponen las siguientes mejoras para su futura evaluación: (A) intervenir jóvenes de menor edad, (B) intervenciones más cortas pero que se repitan a lo largo de un ciclo de la escolaridad (por ejemplo fortalecer o crear el espacio de “educación para la salud” en los colegios); (C) merece consideración la evaluación de intervenciones sexo-específicas, dado que son las mujeres las que más inician a fumar a esta edad pero a su vez las que más respondieron a la intervención y (D) incluir el uso

de nuevas tecnologías ampliamente utilizadas por los jóvenes tales como: mensajes de texto, redes sociales, etc.

La intervención educativa ALIT para el control del tabaco, destinada esencialmente a jóvenes de 12 y 13 años en una sola oportunidad, produjo un descenso significativo en la prevalencia de tabaquismo en el primer año de seguimiento que no se mantuvo en el segundo año. Ahondar el conocimiento sobre los resultados de este tipo de intervenciones, la epidemiología del tabaquismo en los jóvenes y las actitudes de los jóvenes frente al tabaco, son herramientas fundamentales para la elaboración de intervenciones educativas más efectivas y duraderas en el tiempo. La generación de conductas de vida saludables en edades tempranas debería ser uno de los principales campos de investigación e inversión en salud pública.

El presente estudio fue publicado previamente en Gulayin P, Irazola V, Rubinstein A, y otros (2018). Smoke-Free Adolescents. Effectiveness of an educational intervention. Controlled, before and after study. *Arch Argent Pediatr*.

Bibliografía

1. OMS (2008). *Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo. Plan de medidas MPOWER*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
2. Rubinstein A, Colantonio, L., Bardach, A., y otros. (2010) “Estimación de la carga de las enfermedades cardiovasculares atribuible a factores de riesgo modificables en Argentina”. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 27: 237-245.
3. OMS (2009). *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

4. Bardach A, Perdomo HA, Gandara RA, y otros (2016) "Income and smoking prevalence in Latin America: a systematic review and meta-analysis". *Revista Panamericana de Salud Pública*. 4:263-271.
5. Lee S, Ling PM, Glantz SA (2012). "The vector of the tobacco epidemic: tobacco industry practices in low and middle-income countries". *Cancer Causes & Control: CCC*. 23 Suppl 1:117-129.
6. Lim SS, Vos, T., Flaxman, A. D y otros (2012). "A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010". *Lancet*. 380(9859):2224-2260.
7. U.S. Department of Health and Human Services (2012). *Preventing Tobacco Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health.
8. Colombo E, Ghignone, S. y otros (2005). Consenso Tabaquismo. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 103(5):450-475.
9. Ministerio de Salud de la Nación (2013). Encuesta Mundial de Salud Escolar. Ministerio de Salud de La Nación, Argentina. En línea: http://www.msal.gov.ar/ent/images/stories/vigilancia/pdf/2014-05_informe-EMSE-2013-resumen-ejecutivo.pdf. Consultado el 21 de Julio de 2016.
10. Ministerio de Salud de la Nación Dirección de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades No Transmisibles (2011). *Monitoreo del cumplimiento de la legislación sobre ambientes libres de humo en 15 ciudades de Argentina* Boletín de Vigilancia Enfermedades No Transmisibles y Factores de Riesgo 4:25-34.
11. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. *Reducción de los ingresos hospitalarios por síndromes coronarios agudos luego de la implementación exitosa de la legislación 100% libre de humo*. Boletín de

- Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles y Factores de Riesgo 12009;1(6):75-80.
12. Schoj V Alderete M, Ruiz E, y otros. (2010) . “The impact of a 100% smoke-free law on the health of hospitality workers from the city of Neuquen, Argentina”. *Tobacco control*. 19(2): 134-7.
 13. Alcaraz A, Caporale J, Bardach A, y otros. (2016) “Burden of disease attributable to tobacco use in Argentina and potential impact of price increases through taxes”. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 40(4):204-212.
 14. Fernández S, Nebot, M., Jané, M. (2002) “Evaluación de la efectividad de los programas escolares de prevención del consumo de tabaco, alcohol y cannabis: ¿Qué nos dicen los meta-análisis?” *Revista Española de Salud Pública*. 76:175-187.
 15. Laniado-Labrin R, Molgaard, CA., Elder, JP. (1993) “Efectividad de un Programa de Prevención de Tabaquismo en Escolares Mexicanos”. *Salud Pública de México*. 35(4):403-408.
 16. López González L, Comas, Fuentes A., Herrero, Puente P. y otros (1998). “Intervención Educativa Escolar para prevenir el Tabaquismo: Evaluación del Proceso”. *Rev Esp Salud Pública*. 72(4):303-318.
 17. Lovato CY, Pullman AW, Halpin P, y otros. (2010). “The influence of school policies on smoking prevalence among students in grades 5-9, Canada, 2004-2005” *Preventing chronic disease*. 7(6):A129.
 18. Patnode CD, O’Connor, E., Whitlock, E. P., y otros (2013) “Primary Care–Relevant Interventions for Tobacco Use Prevention and Cessation in Children and Adolescents: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force”. *Annals of Internal Medicine*. 158(4):253-260.
 19. Villalbí JR, Aubá, J., García-González, A. (1992) “Evaluación de un Proyecto de Prevención Primaria del Tabaquismo: El proyecto PASE de Barcelona”. *Rev San Hig Púb* 66:113-148.
 20. Borracci RA, Mulassi AH. (2015) “Tobacco use during adolescence may predict smoking during adulthood: simulation-based research”. *Arch Argent Pediatr*. 113(2):106-112.

21. Gulayin PE, Irazola V, Rubinstein A, y otros. "Smoke-Free Adolescents. Effectiveness of an educational intervention. Controlled, before and after study". *Arch Argent Pediatr*. 116(3):e392-e400.
22. Manterola C, Otzen O. "Estudios Experimentales 2ª Parte. Estudios Cuasi-Experimentales". *Int. J. Morphol*. 33(1):382-387.
23. Konfino J, Ferrante D, Goldberg L y otros. "Tobacco use among youths-Argentina, 2007 and 2012" *Morbidity and mortality weekly report*. 63(27):588-590.
24. Brener ND, Kann L, McManus T, y otros.(2002) "Reliability of the 1999 youth risk behavior survey questionnaire". *The Journal of adolescent health*. 31(4):336-342.

Tabla 1. Características basales de los alumnos (CA: 617, CB; 1294) de los colegios participantes antes de la intervención.

	Colegio A	Colegio B	p ^y
	(Intervención)	(Control)	
Promedio de edad – (DS)	14,2 (± 1,18)	14,2 (± 1,20)	0,793
Sexo femenino -n (%)	341/613 (55,6)	522/1284 (40,7)	< 0,01
Prevalencia global de tabaquismo - n (%)	48/611 (7,8)	91/1277 (7,1)	0,572
Prevalencia de tabaquismo por año de curso:			
Primer año - n (%)	3/134 (2,2)	2/273 (0,7)	0,339
Segundo año - n (%)	4/119 (3,4)	7/282 (2,5)	0,738
Tercer año - n (%)	12/137 (8,8)	16/278 (5,8)	0,297
Cuarto año - n (%)	14/125 (11,2)	32/226 (14,2)	0,510
Quinto año - n (%)	15/96 (15,6)	34/218 (15,6)	1,000
Ex fumadores - n (%)	23/611 (3,7)	30/1277 (2,3)	0,100
Fumador experimental - n (%)	127/611 (20,8)	276/1277 (21,6)	0,719
Amigos fumadores - n (%)	456/607 (75,1)	980/1269 (77,2)	0,322
Convivencia con al menos 1 fumador en el hogar - n (%)	318/617 (51,5)	637/1294 (49,2)	0,353
Padre fumador - n (%)	172/617 (27,9)	336/1294 (26)	0,376

Madre fumadora - n (%)	164/617 (26,6)	329/1294 (25,4)	0,615
Hermanos fumadores - n (%)	65/617 (10,5)	130/1294 (10)	0,747

¥ Valor de p a dos colas para el t-test en el caso de la variable continua edad y el Test Exacto de Fisher a dos colas para el resto de las variables.

Tabla 2. Variables asociadas al tabaquismo en la población basal incluidas en el modelo múltiple final.

	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Hermano fumador	2,55	(1,61 - 4,04)	< 0,001
Madre fumadora	2,32	(1,58 - 3,40)	< 0,001
Años de edad	1,92	(1,67 - 2,21)	< 0,001
Sexo femenino	1,75	(1,20 - 2,54)	0,003

Tabla 3. Prevalencia de tabaquismo actual según grupos de edad y sexo según año de seguimiento.

	Colegio A (Intervención)			Colegio B (Control)			p*
	%			%			
	Mujeres	Hombres	Global	Mujeres	Hombres	Global	
Grupo 1' (Primer año, 12 años basal)							
Año 2010	1,3	1,6	1,5	2,3	0	0,7	0,604
Año 2011	1,3	0	0,7	3,4	3,4	3,4	0,104
Año 2012	3,6	6,9	5,3	8,3	7,4	7,7	0,527
Grupo 2" (Segundo – Tercer año, 13 y 14 años basal)							

Año 2010	3,9	8,8	6,2	3,7	2,3	3,0	0,050
Año 2011	4,7	4,6	4,6	11,4	11,1	11,4	0,005
Año 2012	8,0	13,8	11,0	12,2	8,2	10,1	0,777
Grupo 3^{***} (Tercer – Cuarto año, 15 y 16 años basal)							
Año 2010	15,6	9,0	12,9	17,0	13,0	15,1	0,525
Año 2011	12,5	14,1	12,9	20,8	15,3	18,2	0,187

[†] Valor de p a dos colas para el Test Exacto de Fisher para las proporciones globales. * N total grupo 1, colegio A: 138 (2010); 148 (2011) y 132 (2011); colegio B: 276 (2010); 267 (2011) y 260 (2100). ** N total grupo 2, colegio A: 256 (2010); 240 (2011) y 209 (2012), colegio B: 431 (2010), 306 (2011) y 355 (2012), ***N total grupo 3, colegio A: 201 (2010) y 170 (2011), colegio B: 332 (2010) y 281 (2011).

Diarrea infecciosa en pediatría

Nora Beatriz Molina

Resumen

Las enfermedades diarreicas son una causa relevante de morbilidad y mortalidad infantil y constituyen un problema de salud pública sustancial en la población pediátrica de los países en desarrollo. En Argentina, se notifican alrededor de 1 millón de casos de diarrea anuales. Dicho cuadro afecta en mayor medida a la población menor de 5 años y es responsable de 7% a 14% de las internaciones durante la primera infancia. El perfil etiológico de las diarreas infecciosas presenta variaciones estacionales relacionadas con factores demográficos, ambientales, socioeconómicos, geográficos y climáticos. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y estacionalidad de patógenos intestinales en las heces de niños con diarrea que se atienden en el Hospital Blanco Villegas de Tandil durante 2016-2017. Los agentes etiológicos fueron identificados mediante técnicas microbiológicas e inmunológicas. Las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) se detectaron aplicando métodos moleculares (PCR). La frecuencia de diarrea infecciosa fue 40,5%. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Shigella* spp. fueron los patógenos detectados con mayor frecuencia

(80%). En este estudio se detectaron dos aislamientos de *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC, O157, Stx2+). Las diarreas parasitarias y virales fueron halladas en baja proporción. La vigilancia basada en el laboratorio constituye una fuente de información relevante que complementa la vigilancia clínica y epidemiológica. Dicho sistema provee una especificidad complementaria, permite identificar el agente etiológico, determinar la frecuencia y estacionalidad de los enteropatógenos y analizar las tendencias de la enfermedad diarreica. Investigaciones futuras que involucren estudios microbiológicos y moleculares en otras regiones serán necesarias para reconocer los patógenos en la población pediátrica de Argentina.

Palabras clave: diarrea infecciosa, niños, Argentina

Introducción

Las enfermedades diarreicas son una causa relevante de morbilidad y mortalidad infantil y constituyen un problema de salud pública sustancial en la población pediátrica de los países en desarrollo (Lamberti, 2012) (Schrivastava y otros, 2017). Las diarreas representan una de las cinco primeras causas de muerte en Latinoamérica y la segunda causa de malnutrición infantil. Según el Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica realizado por el Ministerio de Salud de la Nación en 2012, se estima que la enfermedad diarreica aguda constituye entre 60 y 80% del motivo de las consultas pediátricas en los servicios de salud de dicha región (Lamberti, 2012).

Los mecanismos patogénicos que ocasionan un cuadro diarreico infeccioso son diversos y están relacionados con los agentes causales que la producen. El mecanismo toxigénico, mediado por enterotoxinas y citotoxinas, es frecuente en bacterias como *Shigella* spp., *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Aeromonas* spp. y *Vibrio cholerae*. En particular, *Shigella dysenteriae* y ciertos

aislamientos de STEC son capaces de producir toxinas Shiga (Stx1, Stx2) y causar enfermedad potencialmente mortal en población pediátrica (Ochoa y otros, 2008) (Croxen y otros, 2013) (Mandell, 2014) (Hebbelstrup y otros, 2014) (Rivas y otros, 2010) (Lopardo, 2016).

La adherencia como mecanismo patogénico ha sido descrita en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Giardia intestinalis*, mientras que, la invasión de los enterocitos con la consiguiente destrucción de la mucosa intestinal es un mecanismo observado en *Cryptosporidium* spp. y Microsporidios. Otro mecanismo de patogenia involucra la destrucción selectiva de células de la mucosa que produce la modificación del equilibrio de absorción y la reducción de las enzimas digestivas del borde en cepillo. Rotavirus, EPEC y *Cryptosporidium* spp. son ejemplos de dicho mecanismo (Ochoa y otros, 2008) (Croxen y otros, 2013) (Mandell, 2014) (Rivas y otros, 2010) (Lopardo, 2016).

El perfil etiológico de las gastroenteritis ha presentado variaciones según la región geográfica. Por ejemplo, en Europa, Estados Unidos, Canadá y Australia los patógenos más frecuentes fueron EPEC y *S. enterica* (Bruzzese, 2018) (Slinger y otros 2017). Por el contrario, en países de África, Asia y Latinoamérica, los principales patógenos fueron *Shigella* spp. y *S. enterica* (Nguyen y otros 2006).

En Argentina, se notifican alrededor de 1 millón de casos de diarrea por año. La enfermedad infecciosa intestinal afecta principalmente a la población menor de 5 años y genera entre 7% y 14% de las internaciones durante la primera infancia. En el país, los principales patógenos reportados son *Shigella flexneri*, EPEC y *S. enterica*. Sin embargo, la etiología de las diarreas suele presentar variaciones geográficas y estacionales relacionadas con diversos factores demográficos, ambientales, socioeconómicos y climáticos (Ghazani y otros, 2018).

La ciudad de Tandil posee clima templado oceánico y una superficie urbanizada irregular. El crecimiento urbano es heterogéneo con las limitaciones que impone el relieve. Las características sanitarias de dicha ciudad presentan semejanzas con otros centros urbanos del

paísy ofrecen un modelo de estudio epidemiológico de diarreas pediátricas en una ciudad intermedia de la provincia de Buenos Aires.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y estacionalidad de los patógenos intestinales en las heces de niños con diarrea que se atienden en el Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante el período 2016-2017.

Hipótesis

Los niños con cuadros de diarrea que se atienden en el Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil presentan patógenos intestinales en las heces.

Materiales y Métodos

El diseño del estudio fue observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal. El área de estudio fue la ciudad de Tandil, provincia de Buenos Aires. La población seleccionada estuvo constituida por niños de ambos géneros, menores de 16 años, que presentaron un cuadro diarreico y que se atendieron en el Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas (HDBV) de la ciudad de Tandil, Argentina. El período de estudio estuvo comprendido entre octubre de 2016 y octubre de 2017. La selección de la muestra poblacional se realizó aplicando un procedimiento de colección por casos consecutivos de los niños que se atendieron en el HDBV durante el período del estudio. Los niños con antecedentes de enfermedad intestinal inflamatoria crónica, niños hospitalizados o con infección nosocomial, niños con en-

fermedades oncohematológicas, inmunosuprimidos y trasplantados fueron excluidos del estudio.

La detección de las bacterias patógenas se llevó a cabo mediante el cultivo de materia fecal. Las heces fueron recolectadas en recipientes estériles de plástico y sembradas en medios selectivos y diferenciales para el desarrollo de *Shigella* spp., *Salmonella enterica*, EPEC, STEC (O157), *Yersinia* spp. y *Aeromonas* spp. La caracterización fenotípica de las bacterias patógenas fue realizada mediante pruebas manuales y automatizadas (VITEK2, BioMérieux) según algoritmos vigentes (Lopardo, 2016). Los aislamientos patógenos se confirmaron con antisueros para *S. enterica* (OMA, OMB), *Shigella* (*S. flexneri*, *S. sonnei*), EPEC (0111, 055, 026, 086, 0119, 0127, 0125, 0126, 0128) y STEC (O157).

La detección molecular de las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) de los aislamientos STEC se llevó a cabo mediante la amplificación molecular de los genes *stx1* y *stx2* según metodología descrita (Molina y otros, s/d) (Leotta y otros, 2005). Los primers utilizados fueron *Stx1a* (GAAGAGTCCGTGGATTACG), *Stx1b* (AGCGATGCAGC-TATAATAA), *Stx2a* (TTAACCACACCCACGGGCAGT) y *Stx2b* (GCTCTGATGCATCTCTGGT). En cada ronda de PCR se utilizaron cepas control: *E. coli* STEC(*stx1/stx2*, O157) y *E. coli* ATCC 25922. La detección de los patógenos virales (Rotavirus y Adenovirus) se realizó mediante un inmunoensayo cromatográfico cualitativo (ICT, Biomerieux). La detección de los parásitos entéricos se realizó mediante técnicas de concentración (Técnica de Willis y de Telemann) y tinciones permanentes (Ziehl-Neelsen modificado, Safranina-azul de metileno, Tricrómica y Gram Cromotrópica) (Feldman, 1990). La información demográfica (edad y género) de los niños y la fecha de realización del estudio se obtuvieron a partir de las historias clínicas informatizadas del hospital.

Resultados

El grupo de estudio quedó constituido por 190 niños, con un leve predominio del género masculino (56%). La población menor de 5 años representó el 80,5%(153/190) de los casos estudiados. La frecuencia de diarrea infecciosa fue 40,5% (77/190) y se hallaron patógenos bacterianos, virales y parasitarios (tabla 1 y figura 1).

Las bacterias aisladas fueron EPEC, STEC, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *S. enterica*. Los 2 aislamientos de STEC presentaron el serotipo O157 y el gen de la toxina Shiga 2 (*stx2*). El agente etiológico de diarrea viral fue Rotavirus y los protozoos hallados fueron *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp.

Las bacterias EPEC y *Shigella* spp. produjeron el 80% de las diarreas infecciosas. EPEC fue el patógeno aislado con mayor frecuencia en el período y fue hallado en niños con diarrea durante las cuatro estaciones del año. El resto de los agentes etiológicos se detectaron en menor proporción y presentaron perfiles estacionales diversos (tabla 2).

Conclusiones

El diagnóstico etiológico de las diarreas infecciosas se centra en dos perspectivas relevantes: el enfoque clínico, para la atención y el seguimiento de pacientes, en particular, en casos que requieren tratamiento antimicrobiano; y el enfoque de salud pública, orientado al control de brotes y vigilancia epidemiológica.

Este trabajo de investigación permitió determinar la presencia y la estacionalidad de patógenos entéricos en la población pediátrica con diarrea que se atendió en el Hospital de Niños de Tandil. La frecuencia de diarrea infecciosa fue 40,5%. Los patógenos EPEC y *Shigella* spp. produjeron el 80% de las diarreas infecciosas. Las diarreas parasitarias y virales fueron halladas en baja proporción.

El diagnóstico molecular tiene un papel emergente en los laboratorios de diagnóstico microbiológico. En este estudio se detectaron dos aislamientos de STEC pertenecientes al serotipo O157 y que presentaron el gen de la toxina Shiga 2.

La vigilancia basada en el laboratorio constituye una fuente de información relevante que complementa la vigilancia clínica y epidemiológica. Dicho sistema provee una especificidad complementaria, ya que permite identificar el agente etiológico de diarrea, determinar la frecuencia y estacionalidad de los patógenos entéricos y analizar las tendencias temporales de la enfermedad diarreica. Investigaciones futuras que involucren estudios microbiológicos y moleculares en otras regiones serán necesarias para reconocer los patógenos bacterianos, virales y parasitarios en la población pediátrica de Argentina.

Financiamiento

Esta investigación fue parcialmente financiada por el subsidio de investigación de la Fundación Alberto J. Roemmers.

Bibliografía

1. Lamberti, L.M., Fischer Walker, C.L., Black, R.E (2012) “Systematic review of diarrhea duration and severity in children and adults in low- and middle-income countries”. *BMC Public Health*, 12, 276-287.
2. Shrivastava, A.K., Kumar, S., Mohakud, N.K. y otros (2017). “Multiple etiologies of infectious diarrhea and concurrent infections in a pediatric outpatient-based screening study in Odisha, India”. *Gut Pathogens*, 9, 16-27.
3. MSAL, Ministerio de Salud de la Nación (2012). “Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica”. En línea: <<http://www.msal.gov.ar>>

- gob.ar/images/stories/boletines/ Boletin-Integrado-De-Vigilancia-N329-SE39.pdf>. Consultado el 20 de septiembre de 2018.
4. Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C. y otros (2008). "New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection". *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102: 852-856.
 5. Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R. y otros (2013). "Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*". *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4): 822-880.
 6. Mandell I, Douglas, and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (eds). 7ª Ed. Elsevier Health Sciences, 2014. New York, United States.
 7. Hebbelstrup Jensen, B., Olsen, K.E., Struve, C. y otros (2014) "Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*". *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 614-630.
 8. Rivas, M., Padola, N.L., Luchessi, P. y otros (2010). "Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina". En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres A (Ed.) USA: Bentham Books.
 9. Lopardo, H.A., Predari, S.C., Vay, C. (eds.) (2016). *Manual de Microbiología Clínica. Bacterias de Importancia Clínica*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
 10. Bruzzese, E., Giannattasio, A., Guarino, A. (2018). "Antibiotic treatment of acute gastroenteritis in children". *F1000 Research*, 7, 193-203.
 11. Nguyen, R.N., Taylor, L.S., Tauschek, M. y otros (2006). "Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children". *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 597-603.
 12. Slinger, R., Lau, K., Slinger, M. y otros (2017). "Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (efa1/lifa) gene". *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16, 16-22.

13. Balbachan, S., Merino, L., Merino, D. y otros (2007). "Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes, Argentina". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(3), 213-217.
14. Giugno, S., Oderiz, S. (2010). "Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44, 63-69.
15. Molina, N.B., Oderiz, S., Bertucci, E. y otros "Detección molecular de *Escherichia coli* diarreigénica en niños con diarrea". En: *Actas del VIII Congreso SADEBAC*. Buenos Aires.
16. Degiuseppe, J.I. (2017). "Trends in hospital discharges for intestinal infectious disease in infants in Argentina, 2005-2013". *Archivos Argentinos de Pediatría*, 115(4), 350-356.
17. Ghazani, M., FitzGerald, G., Hu, W. y otros (2018). "Temperature Variability and Gastrointestinal Infections: A Review of Impacts and Future Perspectives". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(4), e766.
18. Leotta G.A., Chinen I., Epszteyn S. y otros (2005). "Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga". *Revista Argentina De Microbiología*, 37, 1-10.
19. Feldman, R.E., Guardis, M. (1990). *Diagnóstico coproparasitológico*. Buenos Aires. FederaciónBioquímica de la Provincia de Buenos Aires.

Tabla 1: Patógenos entéricos detectados en niños con diarrea.
Tandil, 2016-2017

Patógeno entérico	n	%
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	47	61,1
<i>Shigella flexneri</i>	9	11,7
<i>Salmonella enterica</i>	5	6,4
<i>Blastocystis</i> spp.	3	3,9
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	2	2,6
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	2,6
<i>Giardia intestinalis</i>	2	2,6
<i>Shigella sonnei</i>	1	1,3
Rotavirus	1	1,3
Coinfección EPEC / <i>Blastocystis</i> spp.	4	5,2
Coinfección EPEC / <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	1,3
Total	77	100

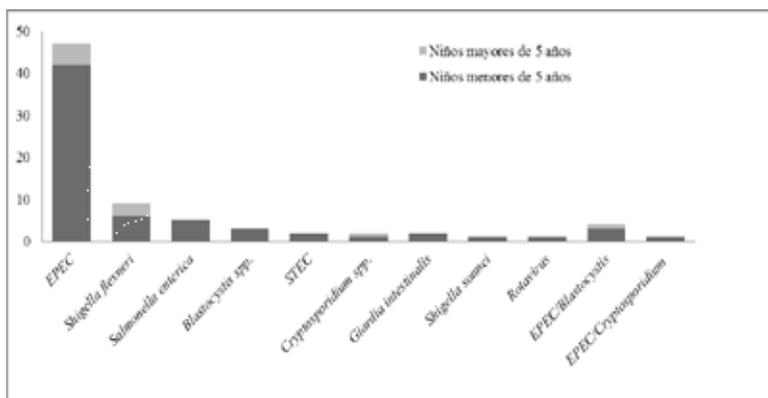


Figura 1: Patógenos intestinales hallados en niños con diarrea según edad.
Tandil, 2016-2017. Fuente: elaboración personal.

Tabla 2: Estacionalidad de los agentes etiológicos de diarrea. Tandil, 2016-2017

Agente etiológico de diarrea	Estación del año			
	verano	primavera	otoño	invierno
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)				
<i>Shigella</i> spp.				
<i>Blastocystis</i> spp.				
<i>Salmonella</i> enterica				
<i>E. coli</i> productora de Toxina Shiga (STEC)				
<i>Cryptosporidium</i> spp.				
<i>Giardia intestinalis</i>				
Rotavirus				
Ausencia del patógeno				
Presencia del patógeno				

Precondicionamiento farmacológico atenuante de la lesión por isquemia-perfusión en trasplante renal experimental.

Marcadores de estrés oxidativo-nitrativo

Natalia Lausada

Introducción

En todo procedimiento de trasplante de órganos y tejidos ocurre un proceso de extracción, mantenimiento e implante de los mismos. Al ser extraído el órgano en el donante queda sin suministro de O_2 y comienza la fase de isquemia, donde se afecta la regeneración de ATP. El metabolismo, ante la ausencia de O_2 , se torna anaeróbico e ineficiente que conduce a la deprivación de fosfatos de alta energía y al depósito de productos ácidos. La bomba sodio potasio dependiente del ATP se torna inoperante y conlleva a la entrada de Na que arrastra moléculas de agua y propende al edema y al aumento del Ca intracelular. Los productos del ATP degradados se metabolizan a urea por acción de la enzima xantino deshidrogenasa. No obstante, ante la presencia de un medio ácido es convertida a xantino oxidasa responsable de generar una variedad de radicales libres originados desde el O_2 molecular (ROS) que llega en el momento de la revascularización del órgano en el receptor, denominados: anión superóxido (O_2^-), hidroxilos (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (St Peter, 2003). A este evento deletéreo de generación de productos altamen-

te reactivos provenientes del O^2 , se suma la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible por isquemia, produciendo altas cantidades de óxido nítrico que al combinarse con O^{2-} genera un compuesto mucho más reactivo aún denominado peroxinitrito ($ONOO^-$) (Toledo-Pereyra y otros, 2004). Esta variedad de sustancias reactivas presentes en la revascularización impactan negativamente sobre la viabilidad del injerto y además exacerbaría los episodios de rechazo. Posteriormente a la superproducción de ROS se activan distintas vías de señalización proinflamatorias, principalmente nuclear factor kappa B (NFkB), activatorprotein -1 (AP-1) y mitogen-activated-proteinkinases (MAPK), entre otras. La segunda fase, al cabo de minutos a algunas horas de inicio del fenómeno implica la expresión de genes de diferentes citoquinas proinflamatorias como interleukina-1b (IL-1b) y factor de necrosis tumoral alpha (TNF α). La tercera fase, se desarrolla de horas a días posteriores al inicio del cuadro y son procesos tendientes a la regeneración del tejido (Toledo-Pereyra, 2004). El proceso inflamatorio instaurado a la reperfusión origina citoquinas que podrían ser producidas in situ desde el injerto, o por linfocitos y macrófagos que infiltran el mismo ya en el donante antes de la extracción del órgano a ser trasplantado, eventos que se exacerban en los donantes cadavéricos (4). Estas citoquinas son las responsables de la diferenciación de subsets de células T en el receptor, tales como Th1, Th2, Th17 y células T regulatorias (Tregs). Estudios en líneas de ratón deficientes en poblaciones específicas de linfocitos mostraron que tanto las células T CD4+ como las células T CD8+ tienen un efecto perjudicial en la isquemia y la reperfusión de los riñones trasplantados (Eltzchig, 2011).

Los eventos descritos clínicamente, en el trasplante renal, se manifiestan por la no-función primaria o función retardada del riñón trasplantado (Salvadori, 2015). En el trasplante renal clínico la tolerancia máxima de isquemia fría, cuando el órgano espera a 4°C en la solución de preservación a ser implantado en el receptor, es de 24 hs y experimentalmente se ha podido elevar a 72 hs. (Cobo, 2009).

No obstante, el daño a la reperfusión es directamente proporcional al tiempo de isquemia provocado (Kezic, 2017).

La bibliografía reporta distintas estrategias para atenuar estas lesiones tratando el órgano donante (pretratamientos al donante) o en la reperfusión inmediata en el receptor (Gondolesi y otros, 1998) (Zhang y otros, 2008). Nuestro grupo divulgó resultados alentadores con el uso de los inmunosupresores sirolimus y tacrolimus administrados al donante evaluando la histopatología de los riñones trasplantados y marcadores pro-inflamatorios (Cicora y otros, 2010-2011-2012).

En el presente trabajo evaluamos marcadores de defensa antioxidante de tipo enzimático y no enzimático a fin de completar los trabajos previos mencionados y poder aportar datos mecanísticos de los inmunosupresores en relación a sus efectos atenuantes de la IIR. Los inmunosupresores tacrolimus y sirolimus disminuyen la síntesis de IL2 al inhibir la calcineurina y el mTOR, respectivamente, enzimas claves en la síntesis de IL2 y otras citoquinas involucradas en la expansión clonal de linfocitos T que median el rechazo celular de los riñones trasplantados (Sabatini, 2017) (Scalea y otros, 2016). Estas drogas poseen propiedades antiinflamatorias capaces de modificar el microambiente inflamatorio generado por la IIR sin que hubiera sido dilucidado aún que acontece con el sistema de defensa antioxidante, clave en la atenuación de los daños oxidativos. Disminuir la magnitud de la IIR permitiría mejorar la viabilidad del riñón trasplantado, resultados que tendrían un impacto satisfactorio en la clínica del trasplante renal.

Objetivo

Evaluar el efecto del tratamiento con tacrolimus-sirolimus al donante, previo a la extracción renal, sobre el daño oxidativo que se manifiesta a la reperfusión postrasplante.

Hipótesis

La combinación de dos inmunosupresores administrados al donante, tacrolimus y sirolimus, atenúan el daño por isquemia reperfusión. Ambas drogas brindarán una mejora significativa en el estatus antioxidante del riñón extraído que se verá reflejado en un menor porcentaje del daño al revascularizar el mismo.

Materiales y Métodos

1. Animales:

Se utilizaron 22 ratas adultas, machos, Wistar (WKAH/Hok), donantes y receptores, para llevar a cabo trasplantes renales isogénicos. Los animales fueron alojados en la sala de internación de roedores de laboratorio de la Cátedra Trasplante, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. Los mismos se recibieron 72 hs antes de la cirugía y fueron mantenidos con un macro ambiente controlado: ciclo de 12 hs. luz y 12 hs. oscuridad, T 23 C \pm 2., extracción de aire regulada a densidad animal, agua y comida ad libitum.

2. Material microquirúrgico

Se utilizó microscopio quirúrgico 25X, instrumental de microcirugía vascular, suturas seda 7-0 y nylon monofilamento 9-0.

3. Técnica quirúrgica

Se implementó la técnica descrita originalmente por Lee col. y modificada por nuestro grupo (Lee, 1961) (Lausada y otros, 2009) (Lausada y otros, 2005). En las ratas donantes y receptoras se utilizó el mismo protocolo anestésico que consistió en anestesia inhalatoria (isoflurano: inducción 4% - mantenimiento 2%) acompañado de premedicación con tramadol 30 mg/kg. Se utilizó como **donante** el riñón izquierdo (Fig. 1A). Una vez ligados y seccionados los vasos

lumbares, adrenales izquierdos y testiculares, se colocaron los cuatro reparos vasculares en la arteria aorta (AO) y la vena cava inferior (VCI) por encima y por debajo del origen de los vasos renales (Fig. 1B). El riñón se lavó con 3 mL de Ringer Lactato, a 4°C heparinizado, por punción arterial, y se preservó en la misma solución (Fig. 1C). El pedículo vascular renal quedó constituido por la vena renal seccionada en su origen y la arteria renal en continuidad con un segmento de AO para aumentar el calibre arterial. El uréter se seccionó próximo al polo renal. A continuación, se inició la cirugía del **receptor** donde luego de abordar el abdomen se realizó la disección de los vasos abdominales 1 cm por debajo del origen de los vasos renales, sitio anatómico donde se obliteró la circulación por clampeo de los mismos. Inmediatamente, se preparó el sitio de implante con arteriotomía de la AO y la venotomía de laVCI (Fig. 1D). Inmediatamente se inició el implante con técnica de anastomosis término-lateral entre la vena renal del donante con la VCI del receptor, y anastomosis término-lateral entre la arteria renal del donante y la AO del receptor, Fig. 1E. A la revascularización el riñón trasplantado debe alcanzar en los primeros 5 minutos la misma coloración y textura que su par contra lateral no trasplantado (Fig. 1F). Los uréteres se anastomosaron con técnica término terminal colocando 4 puntos simples de nylon monofilamento 9-0. Una vez constatada ausencia de hemorragia del sitio de anastomosis, y el aspecto macroscópico del riñón trasplantado es normal, se procedió a realizar las nefrectomías de ambos riñones del receptor de manera tal que la supervivencia del animal dependerá de la funcionalidad del riñón trasplantado. Por último se suturó el abdomen en dos planos muscular y cutáneo.

El postoperatorio se realizó en la sala de recuperación con una temperatura constante de 25°C y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. No obstante, luego de la cirugía la caja del receptor permaneció en el quirófano experimental. La misma se colocó sobre una manta térmica que se mantuvo hasta la total recuperación del animal. Se suministró agua y comida *ad-libitum* colocando dentro

de la jaula frutas y dulces de fácil acceso. El sacrificio para muestreo se realizó mediante exanguinación del animal bajo anestesia general. Para evaluar la cirugía, las ratas fueron controladas meticulosamente: durante las 24 hs postoperatorias, momento del sacrificio.

4. Diseño experimental

Cuatro animales fueron utilizados para mediciones basales (Grupo A). Los receptores se dividieron en aquellos que no recibieron tratamiento previo al donante (Grupo B, N=3) y receptores cuyos donantes fueron tratados con una combinación de tacrolimus-sirolimus 0.3 y 2 mg/kg, respectivamente, vía oral 12 horas previas a la extracción del órgano (Grupo C, N=6). A las 24 h de transcurrido el trasplante los animales fueron sacrificados para determinar en el riñón trasplantado el porcentaje de necrosis tubular aguda por técnicas histológicas y biomarcadores de estrés oxidativo y nitrato (BEON).

Análisis Histológico

Se utilizó tinción con H&E y los resultados fueron informados por dos patólogos que interpretaron los resultados de manera ciega a la pertenencia de cada muestra.

El grado de injuria por isquemia y reperfusión se evaluó siguiendo los criterios de Banff el cual describe el análisis de los riñones trasplantados realizando un score de porcentaje de necrosis tubular aguda (NTA) (De Serres y otros, 2016) (Haas y otros, 2018). El mismo determina: 0= ausencia de NTA; 1= hasta 5% de NTA; 2= 5 a 10% de NTA; 3= 10 a 25% de NTA; 4= 25 a 75% de NTA y 5 más de 75% de NTA.

Determinaciones bioquímicas en tejido

Para determinar indicadores de estrés oxidativo enzimáticos y no-enzimáticos in-situ se evaluó: nitratos + nitritos (NO_x); glutatión peroxidasa total (GSH-Px); glutatión total; superóxido dismutasa dependiente del cobre y del magnesio (SOD); catalasa (CAT); sustancias reactivas al tiobarbiturato (TBARS); glutatión reductasa (GSH-Rd); carbonilos proteicos; α-tocoferol y glutatión transferasa (Arnal, 2010) (Astiz, 2009) (Sedan y otros, 2010).

Resultados

Funcionalidad renal: en los riñones pretratados se observó una disminución significativa del porcentaje de NTA (Fig. 2) que se tradujo en una normalización de los valores de urea y creatinina plasmática (GB 4.7±1.34 mg/dL vs GC 1.1±0.13, P<0.05).

Respecto al sistema de defensa antioxidante tanto enzimático como no-enzimático que se citaron en métodos como BEON el Grupo A muestra los valores normales. Los BEON sufrieron considerables alteraciones en el grupo B comparado con los datos basales, Grupo A, especialmente el contenido de NO_x -indicador de la actividad óxido nítrico sintasa inducible-, TBARS y relación glutatión oxidado/reducido. El pretratamiento del grupo C constituyó un factor protector en cuanto al nivel de antioxidantes endógenos [(α-tocoferol: GA 2.25±0.1 nmol/mg.prot. vs GB 1.13±0.07 y vs GC 1.36±0.08; P<0.05). Asimismo se modificó la actividad de (Cu,Zn)SOD: GA 7.7±0.5 U/mg.prot vs GB 10.7±0.6 y vs GC 7.9±0.2; P<0.05) (Tabla 1).

Discusión

El presente trabajo confirma el efecto protector de ambos inmunosupresores ante un evento severo de IIR post-trasplante renal evaluado a las 24hs del implante. La IIR provoca disfunción renal aguda que se manifestó por el alto grado de necrosis tubular aguda (NTA) de las ratas trasplantadas sin tratamiento. Un rango de NTA de 4 a 5 que indica alrededor de 75 % de necrosis de la corteza renal es un mal predictor de la supervivencia del injerto (Wang, 2009). El pretratamiento medicamentoso demostró una novedosa influencia sobre la producción de ROS que se manifiesta en los marcadores BEON evaluados. Estos resultados coinciden con los reportados por García Criado y col. respecto al tratamiento con tacrolimus. No obstante, los autores trataron con tacrolimus en monoterapia en IIR hepática (García-Criado y otros, 1997). En trabajos previos de nuestro grupo con el mismo diseño experimental se describió el evento de tipo inflamatorio que constituye la IIR con considerables incrementos de TNF- α que induce la NTA por vía mitocondrial o a través de receptores de unión a TNF- α .

Respecto a la producción de ROS los resultados demuestran con los biomarcadores enzimáticos tales como SOD la cual dismuta el O_2^- en O_2 y H_2O_2 , la GH-Px que indica peroxidación lipídica de los ácidos grasos polinosaturados de membrana y CAT que transforma en H_2O y O_2 al H_2O_2 , están incrementadas en el grupo sin tratar demostrando la alta producción de ROS (Wang, 2009). Estos valores disminuyen significativamente al implementar el pretratamiento el donante, indicando la protección de las membranas plasmáticas y mitocondriales. Así mismo, la isquemia induce la sobre producción de óxido nítrico, que en condiciones normóxicas el óxido nítrico induce vasodilatación y ejercería un efecto beneficioso. Sin embargo, las altas concentraciones del mismo altamente reactivo se combinan con O_2^- generado la especie reactiva denominada peroxinitrito, exacerbando los efectos oxidantes (Wang, 2009). Estos valores tam-

bién tienden a normalizarse con el pretatamiento. La disminución en la producción de ROS se corrobora también con los índices que arrojan los cocientes de agentes reductores no enzimáticos que encuentran sus valores disminuidos en un 50% cuando el trasplante no recibe tratamiento alguno y regresa casi a los valores normales con el pretatamiento. El α -tocopherol, mayor antioxidante en la membrana mitocondrial y reconvertida permanentemente, indica otro parámetro de protección por mecanismos no enzimáticos coincidiendo con trabajos realizados en modelos de perfusión ex vivo en isquemia reperfusión hepática de hígados de rata (Gondolesi y otros, 2002). Por último, los resultados indican no sólo la protección de la ácidos grasos polinosaturados de las membranas sino también la atenuación de la oxidación de proteínas utilizando como marcados a los carbonilos proteicos.

Conclusiones

Por todo lo expuesto podemos concluir que el acondicionamiento farmacológico modificó al sistema de defensa antioxidante en su respuesta al daño por isquemia reperfusión. Estos resultados completan trabajos previos que se enfocaban en la evaluación de citoquinas proinflamatorias y genes proapoptóticos. Contar con un modelo estandarizado de trasplante renal en la rata y con los prometedores resultados obtenidos se podrán evaluar otras estrategias a fin de mejorar la calidad de los riñones trasplantados desde el donante.

Bibliografía

- 1- St Peter S.D., Moss, A.A., Mulligan, D.C. (2003). "Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury". *Liver transplantation*, 9(2):105-16.

- 2- Wang, W. Z. (2009). "Investigation of reperfusion injury and ischemic preconditioning in microsurgery". *Microsurgery*, 29(1):72-9.
- 3- Toledo-Pereyra, L.H., Toledo, A.H., Walsh, J., y otros.(2004). "Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion". *Experimental and clinical transplantation*,2(1):174-7.
- 4- Poppelaars, F., Seelen, M. A. (2017). "Complement-mediated inflammation and injury in brain dead organ donors". *Molecular immunology*, 84:77-83.
- 5- Eltzschig, H.K., Eckle, T. (2011). "Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation". *Nature medicine*, 17(11):1391-401.
- 6- Salvadori, M., Rosso, G., Bertoni, E. (2015). "Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment". *World journal of transplantation*, 5(2):52-67.
- 7- Cobo, J.L., Del Rio Gallegos, F. (2009) "Organ preservation". *Med Intensiva*, 33(6):282-92.
- 8- Kezic, A., Stajic, N., Thaiss,F. (2017) "Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy". *Journal of immunology research*,6:54-9.
- 9- Gondolesi, G.E., Semplici, A.M., Luna, G.C., y otros, et al.(1998). "Alpha-Tocopherol reduces hepatocyte ischemia-reperfusion injury in an isolated rat liver model". *Transplantation proceedings*, 30(6):2885-8.
- 10- Zhang, W., Zhu, W., Zhang, J., y otros.(2008). "Protective effects of glucagon-like peptide 2 on intestinal ischemia-reperfusion rats". *Microsurgery*, 28(4):285-90.
- 11- Cicora, F, Lausada, N., Vasquez, D,N,y otros(2011). "Protective effect of immunosuppressive treatment before orthotopic kidney autotransplantation". *Transplantimmunology*, 24(2):107-12.
- 12- Cicora, F, Lausada, N., Vasquez, D.N., y otros (2010). "Sirolimus in kidney transplant donors and clinical and histologic improvement in recipients: rat model". *Transplantation proceedings*, 42(1):365-70.

- 13-Cicora, F., Roberti, J., Lausada, N., y otros(2012). “Immunosuppression in kidney donors with rapamycin and tacrolimus. Proinflammatorycytokineexpression”. *Medicina*, 72(1):3-9.
- 14- Cicora, F., Roberti, J., Vasquez, D., y otros(2012).“Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamacyn to decrease ischaemia-reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model”. *Clinical and experimental immunology*, 167(1):169-77.
- 15-Sabatini, D.M. (2017). “Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45):11818-25. Epub 2017/10/29.
- 16-Scalea, J.R., Levi, S.T., Ally, W, y otros (2016).“Tacrolimus for the prevention and treatment of rejection of solid organ transplants”. *Expert review of clinical immunology*, 12(3):333-42.
- 17-Lee, S.H., Fisher, B. (1961). “Portacaval shunt in the rat”. *Surgery*, 50:668-72.
- 18-Lausada, N., de GomezDumm, I.N., Raimondi, J.C., y otros(2009).“Effect of cyclosporine and sirolimus on fatty acid desaturase activities in cultured HEPG2 cells”. *Transplantation proceedings*, 41(5):1865-70.
- 19-Lausada N, de GomezDummNelva T, Georgina L, y otros (2005).“Effect of different immunosuppressive therapies on the lipid pattern in kidney-transplanted rats”. *Transplantinternational*, 18(5):524-31.
- 20-De Serres, S.A., Noel, R., Cote, I., y otros(2016).“2013 Banff Criteria for Chronic Active Antibody-Mediated Rejection: Assessment in a Real-Life Setting”. *American journal of transplantation*, 16(5):1516-25.
- 21-Haas, M., Loupy, A., Lefaucheur, C. y otros (2018).“The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials”. *American journal of transplantation*, 18(2):293-307.

- 22-Arnal, N., de Alaniz, M.J., Marra, C.A. (2010).“Alterations in copper homeostasis and oxidative stress biomarkers in women using the intrauterine device TCu380A”. *Toxicologyletters*, 192(3):373-8.
- 23-Lausada, N., Arnal, N., Astiz, M., y otros(2015).“Dietary fats significantly influence the survival of penumbral neurons in a rat model of chronic ischemic by modifying lipid mediators, inflammatory biomarkers, NOS production, and redox-dependent apoptotic signals”. *Nutrition*, 31(11-12):1430-42.
- 24-Astiz, M., de Alaniz, M.J., Marra, C.A. (2009). “Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues”. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(7):2025-32.
- 25-Sedan, D., Andrinolo, D., Telese, L., y otros(2010).“Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: its relation to liver lipid composition”. *Toxicol*, 55(2-3):333-42.
- 26-Garcia-Criado, F.J., Palma-Vargas, J.M., Valdunciel-Garcia, J.J. y otros (1997).“Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia”. *Transplantation*, 64(4):594-8.
- 27-Cicora, F., Roberti, J., Lausada, N., y otros(2012).“Donor preconditioning with rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney transplantation”. *Transplant immunology*, 27(1):1-7.
- 28-Cicora, F., Stringa, P., Guerrieri, D., y otros(2012).“Amelioration of renal damage by administration of anti-thymocyte globulin to potential donors in a brain death rat model”. *Clinical and experimental immunology*, 169(3):330-7.
- 29-Cicora, F., Stringa, P., Guerrieri, D., y otros(2013).“Evaluation of histological damage of solid organs after donor preconditioning with thymoglobulin in an experimental rat model”. *Transplant immunology*, 28(4):203-5.
- 30-Gondolesi, G.E., Lausada, N., Schinella, G., y otros(2002). “Reduction of ischemia-reperfusion injury in parenchymal and nonparen-

chymal liver cells by donor treatment with DL-alpha-tocopherol prior to organ harvest". *Transplantation proceedings*, 34(4):1086-91.

Resumen

Introducción: dentro de las nuevas estrategias para mejorar la calidad de los órganos procurados para trasplante se encuentra el precondicionamiento farmacológico al donante para atenuar la injuria por isquemia y reperfusión (IIR) presente en el receptor.

Objetivo: evaluar el efecto del pretratamiento con tacrolimus-sirolimus al donante, previo a la extracción renal, utilizando parámetros histológicos y bioquímicos de IIR en ratas con trasplante renal isogénico.

Métodos: se utilizaron 22 ratas adultas Wistar machos para mediciones basales (grupo A, N=4) y trasplantes del riñón izquierdo con nefrectomía del riñón derecho del receptor. Se dividieron los receptores en los que no recibieron tratamiento (grupo B, N=3) y receptores cuyos donantes fueron tratados con tacrolimus-sirolimus 0.3 y 2 mg/kg, respectivamente, vía oral 12 horas previas a la ablación (grupo C, N=6). A las 24 horas los animales fueron sacrificados para determinar en el riñón trasplantado (RT) el porcentaje de necrosis tubular aguda (NTA); TNF α ; biomarcadores de estrés oxidativo y nitrativo o BEON (antioxidantes lipo e hidrosolubles, nitratos+nitritos o [NOx], y varias enzimas del sistema de defensa antioxidante). En plasma se evaluó urea y creatinina.

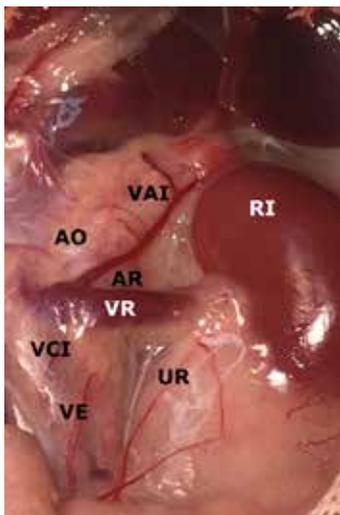
Resultados: en los riñones pretratados se observó una disminución significativa del porcentaje de NTA que se tradujo en una normalización de los valores de urea y creatinina plasmática (GB 4.7 ± 1.34 mg/dL vs GC 1.1 ± 0.13 , $P < 0.05$). Los BEON sufrieron alteraciones en el grupo B especialmente el contenido de [NOx] -indicador de la actividad óxido nítrico sintetasa inducible-, TBARS (sustancias reactivas al tiobarbiturato) y relación glutatión oxidado/reducido. El pretratamiento del grupo C constituyó un factor protector respecto a los

antioxidantes endógenos [(α tocoferol: GA 2.25 ± 0.1 nmoles/mg.prot. vs GB 1.13 ± 0.07 y vs GC 1.36 ± 0.08 ; $P < 0.05$). Además, se modificó la actividad de (Cu,Zn)SOD: GA 7.7 ± 0.5 U/mg.prot vs GB 10.7 ± 0.6 y vs GC 7.9 ± 0.2 ; $P < 0.05$).

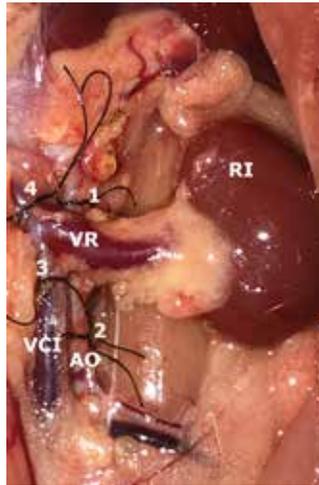
Conclusión: el acondicionamiento farmacológico modificó al sistema de defensa antioxidante en su respuesta a la IIR, incrementando la supervivencia del tejido, de modo que la administración al donante de drogas inmunosupresoras podría conferir una protección adicional reflejada en la mejoría de la arquitectura del órgano y su funcionalidad.

Figura 1. Técnica quirúrgica: modelo microquirúrgico de trasplante renal en la rata

1.A. Indica las abreviaturas utilizadas para referenciar las estructuras anatómicas que se observan durante el acto quirúrgico. Arteria aorta (AO), arteria renal (AR), riñón izquierdo (RI), uréter (UR), vasos adrenales izquierdos (VAI), vena cava inferior (VCI), vena espermática (VE), y vena renal (VR). Como referencia de media el riñón de la rata mide en promedio 1.5 por 1.0 cm y la AO en un rango de 1 a 2 mm.



1.B. Cirugía del donante. Disección del riñón izquierdo y su pedículo vascular. Las flechas blancas indican los cuatro reparos vasculares proximal y distal al origen de la arteria y de la vena renal.



1.C. Lavado del órgano por punción de la AO. Nótese el cambio de color del RI, respecto a la Figura 2.B. que se torna pálido en forma homogénea al lavar con la solución de perfusión que drena hacia VCI.



1.D. Abordaje y clampeo de los vasos abdominales del receptor (AO y VCI) por debajo del origen de los vasos renales, clamp proximal (*) y dejando un espacio de aproximadamente 1,5 cm entre ambos se coloca el clamp distal (&) por encima del origen de los vasos ilíacos. La aguja de insulina realiza por punción el ojal que se prolonga con tijeras para realizar la venotomía y arteriotomía.



.E. Anastomosis término-lateral de la VR del riñón trasplantado (RT) con la VCI del receptor. Se observan los puntos tractores o directrices que unen ambas estructuras vasculares para iniciar la anastomosis con nylon monofilamento 9-0.
1.F. RT revascularizado tras la apertura de los clamps vasculares.

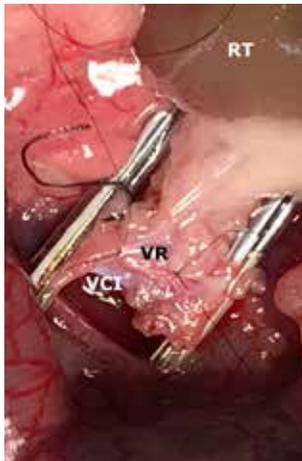
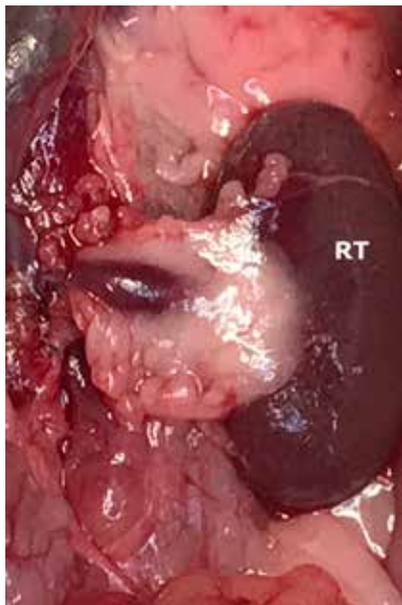


Figura 2. Niveles de creatinina en plasma 24 hs postrasplante. Grupo B trasplante sin tratamiento y grupo C trasplantado con pretratamiento con los inmunosupresores. Los valores se expresan media \pm DE ** $p < 0.01$.



Estudio epidemiológico de las infecciones por PolyomavirusBK (BKV) en receptores de trasplante renal

Marisa M. Cobos

Introducción

BKV pertenece a la familia polyomaviridae. Inicialmente se clasificó en los Subtipos I a IV, según su reactividad antigénica. Más tarde, al estudiarse el genoma viral, se identificaron las sustituciones de nucleótidos en el gen VP1 como responsables de esa diversidad inmunoserológica, dando lugar a la clasificación molecular en los subtipos I a IV y a la visualización, a través del análisis filogenético de los subgrupos dentro del subtipo 1, que están estrechamente relacionados con poblaciones humanas de ciertos grupos étnicos.

La infección primaria por BKV ocurre durante la infancia. El virus permanece latente en el urotelio, pudiendo reactivarse en situaciones inmunológicas particulares, como la importante deficiencia de inmunidad celular que presentan los pacientes sometidos a trasplante renal.

En este grupo de pacientes, el BKV, puede producir nefropatía con alto riesgo de fallo del injerto, dada la falta de tratamientos específicos (Hirsch, 2009).

Durante la reactivación puede demostrarse la excreción viral inicialmente en orina y posteriormente en sangre, previamente al desarrollo de nefropatía. El seguimiento periódico de la excreción viral y la toma de medidas preventivas, tempranas ante su identificación, pueden modificar la evolución de la infección.

El propósito de este estudio es conocer la prevalencia de variantes virales de BKV a través de métodos de desarrollo “inhouse” y su evolución clínica en receptores de trasplante renal.

Materiales y métodos

Las muestras de orina y sangre periférica de 66 receptores de trasplante renal de la provincia de Buenos Aires, Argentina, fueron analizados sistemáticamente cada tres meses, así como cuando se evidenció disfunción del injerto. Aquellas biopsias renales realizadas a pacientes por disfunción del injerto se incluyeron en el estudio para la detección de BKV.

Las muestras de tejido se trataron con proteinasa k (10 mg / ml) durante 2 horas, después de lo cual se inactiva por calor y luego se somete a extracción de ADN.

El de ADN de muestras de sangre periférica y orina fue extraído usando el método Boom (Boom, 1990), como se describe en la bibliografía.

El protocolo descrito por Takasaka en 2004, con modificaciones, se siguió para la amplificación por PCR. Se utilizaron los siguientes cebadores: 327-IPST (5'-GCCTGCAGCAAGTGCCAAAACACTAC-TAAT-3') y 327-2HIN (5'GCAAGCTTGCATGAAGGTTAAG-CATGC-3')

Cada amplificación se realizó en un volumen de reacción de 20 µl que contenía 2-5 µl de DNA viral, MgCl₂ 3 mM, 0,1 µM de dNTPS, 0,2 µM de cada cebador (327-1PST y 327-2HIN) y 2 Ude la ADN polimerasa Taq (Invitrogen).

La amplificación consistió en 30 ciclos: desnaturalización a 95° durante 3 minutos, recocido a 56° durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72° durante 5 minutos. Los productos de PCR de 287pb se detectaron con electroforesis enGel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio utilizando un transiluminador con luz UV.

Todos los productos de amplificación se purificaron con columna (Qiagen) y se secuenciaron con Método de secuenciación Sanger en un secuenciador ABI310.

Todas las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de referencia obtenidas del GenBank y se analizaron con el programa BioEdit.

El análisis filogenético se realizó mediante Saitoutneighbour-joiningmethod (Takasaka, 2004) con un valor inicial de 1000.

Resultados

Se analizaron muestras de 66 pacientes, de los cuales 25 tenían muestras de orina positivas, representando el 37.87% de los estudiados.

La genotipificación mostró la siguiente distribución: 22 (88%) pertenecían al Subtipo I, 3 (12%) aSubtipo II. No se encontraron BKV pertenecientes a los subtipos III o IV.

En cuanto a los subgrupos del subtipo I, se identificaron los siguientes: 1 (4,54%) de Ia, 11 (50%) de Ib1 y 10 (45,45%) de Ib2.

No se mostró la presencia del Subgrupo Ic

Nueve pacientes (36%) presentaron viremia, con valores significativos de carga viral. En todos los casos de viremia, se realizó una reducción de la dosis o modificación del esquema inmunosupresor.

Entre los pacientes virémicos, 3 coincidieron con interurrencias, 1 rechazo tubulointerstitial y 2 complicaciones infecciosas. Uno de estos pacientes presentó pérdida de la función del injerto. Los restan-

tes 6 pacientes virémicos no mostraron intercurencias coincidentes. Uno de estos pacientes sufrió pérdida de la función de injerto.

De los 9 receptores virémicos, 7 tenían infección por genotipo Ib1 (77,77%).

En cuanto a los receptores con fallo de la función del injerto, la que coincidió con la intercurencia infecciosa fue producida por genotipo Ib2, mientras que el receptor que no coincidió con las intercurencias presentó genotipo Ib1.

Discusión

La presencia de viruria y viremia por BKV coincide con la mostrada en otros estudios nacionales e internacionales. (Schiavelli, 2014). La identificación encontrada en los subtipos, convierte al I en el predominante, mostrando una distribución similar entre los subgrupos Ib1 y Ib2, correlacionando estos datos con estudios realizados en redes de alcantarillado de nuestro país (Sosa, 2012).

La frecuencia de los subtipos y subgrupos de virus BK se podría estimar de acuerdo con la geografía de origen de la población estudiada, bajo teorías de comigración desarrolladas por otros autores (ShanZhong, 2009) (Yoshiaki, 2009).

El genotipo Ib-1 prevalece en el sudeste de Asia (ShanZhong, 2009) (Huai-Ying, 2007), mientras que Ib2 es prominente en Europa.

A pesar de que una proporción importante de los habitantes de la provincia de Buenos Aires descendientes de inmigrantes europeos, el genotipo Ib1 de origen asiático, se encontró en la misma proporción. Estos hallazgos coinciden con los publicados en Brasil (Zalona, 2011)

Como ha sido presentado por otros autores, el genotipo de origen familiar podría ser reemplazado por genotipos presentes en la comunidad (Yoshiaki, 2007). La transmisión horizontal del virus podría comenzar antes de la llegada de inmigrantes a Sudamérica.

Cabe mencionar que 6 de los 9 receptores con viremia presentaron el genotipo Ib1, un hallazgo para ser considerado al definir el seguimiento en este tipo de huéspedes.

Conclusiones

La detección de viruria y viremia permite una adaptación temprana del tratamiento inmunosupresor, un hecho importante para controlar la progresión hacia la nefropatía.

No hemos encontrado otros informes de estudios moleculares de prevalencia de BKV en receptores de trasplante renal en Argentina.

Nuestros hallazgos sugieren que las frecuencias genotípicas no pueden predecirse de acuerdo con el origen migratorio de la población en estudio y que la genotipificación podría estar relacionada con la evolución de la enfermedad en el receptor.

Bibliografía

1. Hirsch H. H. et al. (2009) “Infectious Diseases Community of Practice” *American Journal of Transplantation*, 9 (Suppl 4), S136–S146
2. Boom R. et al. (1990) “Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids” *Journal of Clinical Microbiology*, 495-503
3. Takasaka T. et al. (2004) “Subtypes of BK Virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region”. *Journal of General Virology*, 85, 2821 – 2827
4. Saitou N, et al. (1987) “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic Trees”. *Mol Biol Evol*, 4, 406-425
5. Schiavelli R et al. (2014) “First Epidemiologic Study in Argentina of the Prevalence of BK Viruria in Kidney Transplant Patients”. *Transplantation Proceedings*, 46, 3010-3014

6. Sosa M, et al. (2012) "Detección y genotipificación filogenética de cepas de poliomavirusbk en muestras de aguas residuales de Córdoba, Argentina". *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 69, (supl.2), 119-120
7. ShanZhong et al.(2009)"Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race". *Journal of General Virology* , 90, 144-152
8. Yoshiaki Yogo et al. (2009) "Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications" *Rev. Med. Virol*, 19, 185-199
9. Huai-Ying Zheng et al. (2007) "Relationships between BK virus lineages and human populations" *Microbes and Infection*, 204-213
10. Zalona AC et al. (2011) "Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil" *J Med Virol.*, 83(8), 1401-5
11. Yoshiaki Yogo et al. (2007) "Occurrence of the European subgroup of subtype I BK polyomavirus in Japanese-Americans suggests transmission outside the family". *J Virol*, 81, 13254-13258.

Enterococos de alimentos cárnicos

Mónica Sparo

Resumen

Las bacterias del género *Enterococcus* integran la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de animales y del hombre, pudiendo persistir en nichos con escasos nutrientes disponibles como el agua y el suelo. Los enterococos resisten a la pasteurización y por lo tanto habitan en las materias primas (carne, leche) y en alimentos con tratamiento térmico.

Se ha observado la emergencia de cepas de enterococos como agentes etiológicos de infecciones severas. La especie *Enterococcus faecalis* es la recuperada con mayor frecuencia en animales, alimentos de origen animal y en pacientes con infecciones. En medicina humana la resistencia de alto nivel a gentamicina en enterococos representa un problema terapéutico significativo. Se demostró que el gen relacionado con la resistencia a antibióticos puede ser transferido en forma horizontal desde *E. faecalis* de alimentos de origen animal hacia otra cepa de origen humano.

La utilización de antimicrobianos de amplio espectro en pacientes con comorbilidades asociadas origina un desbalance de la microbio-

ta intestinal con niveles mayores de colonización por *E. faecalis*, pudiendo suceder translocación intestinal de esta bacteria con ocurrencia de infección invasiva. El tracto gastrointestinal es un reservorio masivo de bacterias con potencial de adquirir y transferir resistencia antimicrobiana. Como consecuencia, las bacterias presentes en los alimentos y la información genética que contienen tienen relevancia para la salud humana.

El partido de Tandil integra un núcleo en la región del centro de la Provincia de Buenos Aires con intensa actividad agrícola y ganadera y con actividades industriales relacionadas que generan consumo de sus productos a nivel local, provincial, nacional e internacional.

El objetivo del siguiente trabajo fue investigar la relación clonal entre cepas de *Enterococcus* spp. con alto nivel de resistencia a gentamicina (ANRG) aislados de alimentos de origen cárnico y de infecciones invasivas en la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires.

Durante enero a diciembre de 2013 se almacenaron aislamientos significativos de *Enterococcus* spp. con ANRG provenientes de muestras clínicas de pacientes con infecciones invasivas, internados en el Hospital Ramón Santamarina de Tandil, Provincia de Buenos Aires (HRS) y de alimentos de origen cárnico, obtenidos de carnicerías de la zona céntrica y periférica de la ciudad de Tandil con venta de productos fermentados cárnicos de elaboración local (salamines). En total se procesaron 1732 muestras de alimentos de origen cárnico; se recuperaron 57 aislamientos que fueron identificados como pertenecientes al género *Enterococcus*. Las especies más frecuentes recuperadas de alimentos de origen cárnico fueron *E. faecalis* y *E. faecium*. En relación a la resistencia a gentamicina, se detectó el gen que codifica para ANRG todos pertenecieron a la especie *E. faecalis* en un bajo porcentaje de muestras cárnicas. Los alimentos de origen cárnico constituyen un reservorio de enterococos con resistencia de alto nivel a los antimicrobianos de frecuente utilización clínica en medicina humana. A través de estudios de PFGE se demostró relación clonal

entre cepas de *E. faecalis* con ANRG de origen humano y de alimentos; existiendo una diseminación en el ecosistema analizado.

Los resultados de esta investigación reafirman la necesidad de incrementar los esfuerzos en el control la resistencia antimicrobiana no solamente desde la medicina humana sino con la participación conjunta de todos los actores involucrados en la producción de alimentos y de la comunidad en general.

Introducción

Las bacterias del género *Enterococcus* integran la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de animales y del hombre, pudiendo persistir en nichos con escasos nutrientes disponibles como el agua y el suelo. Los enterococos resisten a la pasteurización y por lo tanto habitan en las materias primas (carne, leche) y en alimentos con tratamiento térmico (Sparo, 2001) (Delpech y otros 2012).

Desde fines del siglo pasado se ha observado la emergencia de cepas de enterococos como agentes etiológicos de infecciones severas, bacteriemias, meningitis, endocarditis e infecciones post-quirúrgicas y del tracto urinario (Gentile y otros 1995) (Ceci y otros, 2015).

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia natural de alto nivel a diversos antimicrobianos como cefalosporinas, trimetoprima/sulfametoxazol y polimixinas y resistencia natural de bajo nivel a lincosamidas y aminoglucósidos. Además, pueden adquirir resistencia de alto nivel a los antimicrobianos de utilización frecuente en medicina humana y veterinaria mediante mutaciones genéticas y transferencia génica. Los enterococos pueden contener una gran variedad de elementos genéticos móviles y son considerados como un reservorio para los genes de resistencia adquirida a los antimicrobianos por bacterias Gram positivas. En infecciones severas para lograr actividad bactericida es necesaria la asociación de antimicrobianos

como glucopeptidos o β -lactámicos y aminoglucósidos. También pueden asociarse dos β -lactámicos (Sparo, 2018).

La especie *Enterococcus faecalis* es la recuperada con mayor frecuencia en animales, alimentos de origen animal y en pacientes con infecciones asociadas a los cuidados de la salud. En medicina humana la resistencia de alto nivel a gentamicina (CIM $\geq 500 \mu\text{g} / \text{mL}$) en enterococos representa un problema terapéutico significativo, en particular para los pacientes inmunosuprimidos y con enfermedades infecciosas como meningitis, osteomielitis y endocarditis, que requieren tratamiento antimicrobiano con eficacia bactericida (asociación β -lactámico o glucopeptido y gentamicina). El gen *aac* (6')-*Ie-aph* (2')-*Ia*, que codifica la enzima AAC(6')-APH(2'') con actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa, es el más frecuente. Previamente, nuestro grupo de investigación ha demostrado la posibilidad de la transferencia horizontal de este gen desde *E. faecalis* de alimentos de origen animal hacia otra cepa de origen humano (*E. faecalis* JH2-2, *Gilmore Lab*, US) mediante un modelo animal, utilizando ratones BALB-c inmunocompetentes colonizados transitoriamente con microbiota intestinal humana (Sparo, 2013 – 2018) (Ceci y otros 2015).

La utilización de antimicrobianos de amplio espectro (cefalosporinas de tercera y cuarta generación) en pacientes con comorbilidades asociadas origina un desbalance de la microbiota intestinal con niveles mayores de colonización por *E. faecalis*, pudiendo suceder translocación intestinal de esta bacteria con ocurrencia de infección invasiva. El tracto gastrointestinal es un reservorio masivo de bacterias con potencial de adquirir y transferir resistencia antimicrobiana. Como consecuencia, las bacterias presentes en los alimentos y la información genética que contienen tienen relevancia para la salud humana.

El partido de Tandil integra un núcleo en la región del centro de la Provincia de Buenos Aires con intensa actividad agrícola y ganadera y con actividades industriales relacionadas que generan consumo de sus productos a nivel local, provincial, nacional e internacional.

Objetivo

Investigar la relación clonal entre cepas de *Enterococcus* spp. con alto nivel de resistencia a gentamicina (ANRG) aislados de alimentos de origen cárnico y de infecciones invasivas en la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires.

Hipótesis

Los enterococos pueden colonizar los alimentos cárnicos y constituir un reservorio de cepas con resistencia a los antimicrobianos de utilización frecuente en medicina humana; con potencial diseminación al hombre a través de la cadena alimentaria.

Materiales y Métodos

Durante un año (enero-diciembre de 2013) se almacenaron aislamientos significativos de *Enterococcus* spp. con ANRG provenientes de muestras clínicas de pacientes con infecciones invasivas, internados en el Hospital Ramón Santamarina de Tandil, Provincia de Buenos Aires (HRS) y de alimentos de origen cárnico, obtenidos de carnicerías de la zona céntrica y periférica de la ciudad de Tandil con venta de productos fermentados cárnicos de elaboración local (salamines).

La recolección de muestras de origen cárnico se realizó durante las cuatro estaciones del año. El aislamiento y la caracterización fenotípica inicial de género se realizaron de acuerdo a lo descrito anteriormente (Delpech y otros, 2012).

Los enterococos de origen clínico fueron caracterizados fenotípicamente y provistos por el Laboratorio de Microbiología Clínica del HRS.

El almacenamiento de los aislamientos de enterococos se efectuó por triplicado a -20°C y -70°C en caldo cerebro corazón con glicerol 30%.

Posteriormente, en todos los aislamientos (humanos y de alimentos), que fueron incluidos como pertenecientes al género *Enterococcus*, se efectuó la caracterización molecular de género y de especies mediante amplificación génica (PCR múltiple) del gen *sodA* que codifica para la enzima superóxido dismutasa (Jackson *et al.*, 2004).

En todos los aislamientos de *Enterococcus* spp., de origen humano y de alimentos cárnicos, se investigó la presencia de los genes de resistencia a gentamicina *aac* (6') -*Ie-aph* (2'')-*Ia*, *aph* (2'')-*Ib*, *aph* (2'')-*Ic* y *aph* (2'')-*Id* por amplificación génica mediante PCR múltiple (Sparo y otros, 2013).

Para evaluar la relación genética entre los aislamientos de enterococos con ANRG se efectuó su caracterización epidemiológica molecular mediante electroforesis de campo pulsado (*Sma*1-PFGE). Los patrones resultantes de la electroforesis se analizaron de manera visual (Tenover y otros, 1995) (Saedi y otros, 2002) (Pourcel y otros, 2017).

Resultados

En total se procesaron 1732 muestras de alimentos de origen cárnico. En la **Tabla 1** se muestra la distribución de muestras durante el período analizado (enero-diciembre de 2013).

En total se recuperaron n=57 aislamientos que fueron identificados como pertenecientes al género *Enterococcus*. Las especies más frecuentes recuperadas de alimentos de origen cárnico fueron *E. faecalis* y *E. faecium* (**Tabla 2**).

En relación a la resistencia a gentamicina, en 3/57 (5,3%) de los aislamientos de alimentos cárnicos se detectó el gen *aac* (6')-*Ie-aph*

(2'')-Ia que codifica para ANRG. Todos pertenecieron a la especie *E. faecalis* (**Tabla 3**).

Simultáneamente, durante el período analizado se recuperaron *E. faecalis* con ANRG en 4 pacientes con infecciones invasivas, internados en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del HRS. Los aislamientos clínicos fueron provenientes de hemocultivo (n=3) y líquido abdominal (n=1).

A través del análisis de *Sma*I-PFGE se demostró que los siete aislamientos de *E. faecalis* (EFA) con ANRG se podían diferenciar en cuatro tipos clonales: EFA-A, EFA-B, EFA-C y EFA-D. El clon A estuvo representado en cuatro aislamientos, dos (EFA HRSRG215, hemocultivo y EFA HRSRG304, punción abdominal) provenientes de pacientes con infecciones invasivas internados en UTI y dos aislamientos (EFA CEB82 y EFA CEB88) recuperados de carne picada. Los clones restantes fueron B (EFA HRSG16, hemocultivo), C (EFA HRSRG291, hemocultivo) y D (EFA CEB72, salami). Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Conclusiones

Los alimentos de origen cárnico constituyen un reservorio de enterococos con resistencia de alto nivel a los antimicrobianos de frecuente utilización clínica en medicina humana, como son los aminoglucósidos (gentamicina).

Todos los aislamientos con ANRG en el período analizado pertenecieron a la especie *E. faecalis*. En el total de *E. faecalis* con ANRG se detectó el gen *aac* (6'')-*Ie-aph* (2'')-Ia.

El ANRG limita las opciones terapéuticas en las infecciones invasivas producidas por enterococos en el hombre; ya que se invalida la asociación sinérgica entre este fármaco con antimicrobianos β -lactámicos o glucopéptidos. La posibilidad de diseminación a la microbiota humana de cepas de *E. faecalis* con ANRG destaca la relevancia

de la detección de este mecanismo de resistencia en los enterococos colonizantes de los alimentos de origen animal.

A través de estudios de PFGE se demostró relación clonal entre cepas de *E. faecalis* con ANRG de origen humano y de alimentos; existiendo una diseminación en el ecosistema analizado.

Los resultados de esta investigación reafirman la necesidad de incrementar los esfuerzos en el control la resistencia antimicrobiana no solamente desde la medicina humana sino con la participación conjunta de todos los actores involucrados en la producción de alimentos y de la comunidad en general.

Bibliografía

- 1-Sparo, M.D., Mallo R.A. (2001). "Evaluación de la flora bacteriana en un ensilado natural de maíz". *Revista Argentina de Microbiología*, 33, 75-80.
- 2-Delpech, G., Pourcel G., Schell, C. y otros (2012). "Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from artisanal food of animal origin in Argentina". *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(10), 939-944.
- 3-Gentile, J.H., Sparo, M.D., Pipo, V.B. y otros (1995). "Meningitis a *Enterococcus faecalis*". *Medicina*, 55, 435-437.
- 4-Ceci, M., Delpech, G., Sparo, M. y otros (2015). "Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*". *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(11), 1195-1203.
- 5-Sparo, M., Delpech, G., García Allende, N. (2018). "Impact on Public Health of the spread of high-level Resistance to Gentamicin and Vancomycin in enterococci". *Frontiers in Microbiology*, 18 December 2018 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03073>
- 6-Sparo, M., Urbizu, L., Solana, M.V., Pourcel, G. y otros (2012). "High level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococ-*

- cus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota”. *Letters in Applied Microbiology*, 54, 119-125.
- 7-Sparo, M., Delpuch, G., Pourcel, G. y otros (2013). “Cytolysin and high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* from different origin”. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, 8(2), 5-10.
- 8-Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B. (2004). “Use of a genus and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci”. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3558-3565.
- 9-Tenover F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V. y otros (1995). “Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing”. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- 10-Saeedi, B., Hälgren, A., Jonasson, J. y otros (2002). “Modified pulsed field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci”. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 110, 869-874.
- 11-Pourcel, G., Sparo, M., Corso, A. y otros (2017). “Molecular Genetic Profiling of Clinical and Foodborne Strains of Enterococci with High Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin”. *Clinical Microbiology Open Access*, 6 (1), 272-280.

Palabras claves: Enterococcus. *E. faecalis*. Alimentos de origen humano y animal. Antimicrobianos

Tabla 1. Distribución de muestras de alimentos según origen y cantidad

	Salamin local	Carne picada
Número de muestras	652	1080

Tabla 2. Distribución de especies de enterococos en alimentos cárnicos

Especie	Aislamientos cárnicos
<i>E. faecalis</i>	42
<i>E. faecium</i>	8
<i>E. raffinosus</i>	3
<i>E. gallinarum</i>	1
<i>E. durans</i>	2
<i>E. avium</i>	1

Tabla 3. Aislamientos de *E. faecalis* de alimentos cárnicos con ANRG

Aislamiento	Origen	Muestra	Especie	Gen <i>aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia</i>
CEB72	Cárnico	Salamin	<i>E. faecalis</i>	+
CEB82	Cárnico	Carne picada	<i>E. faecalis</i>	+
CEB88	Cárnico	Carne picada	<i>E. faecalis</i>	+

Tabla 4. Origen de los aislamientos de *E. faecalis* (EFA) y relación clonal

Aislamiento	Origen	Muestra	SmaI-PFGE
HRSRG16	Clínico, UTI	Hemocultivo	EFA-B
HRSRG215	Clínico, UTI	Hemocultivo	EFA-A
HRSRG291	Clínico, UTI	Hemocultivo	EFA-C
HRSRG304	Clínico, UTI	Líquido de punción abdominal	EFA-A
CEB72	Alimento cárnico	Salamin	EFA-D
CEB82	Alimento cárnico	Carne picada	EFA-A
CEB88	Alimento cárnico	Carne picada	EFA-A

Estudio del cáncer de mama en Polvaredas, Partido de Saladillo, Provincia de Buenos Aires

Luciano Cermignani

Resumen

Se realizó un estudio descriptivo en la totalidad de una comunidad rural de la provincia de Buenos Aires considerando los factores de riesgo del cáncer de mama, las estrategias de prevención y la incidencia. El estudio comprendió 83 mujeres de 40 a 75 años de edad. A todas las mujeres se las encuestó con un cuestionario que incluyó 34 ítems; asimismo, se les realizó una mamografía y/o una ecografía mamaria. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el ANOVA HSD Tukey y la asociación entre las variables se estudió mediante el test de χ^2 ($P < 0.05$). Resultados: la edad promedio fue de 54,5 años; de la totalidad de las mujeres, la mayoría eran postmenopáusicas (69%) y el 96% tenían hijos, siendo el promedio de lactancia de 10 meses/hijo; el índice de masa corporal en promedio fue de 27,8 kg/m²; 13% tenían familiares de primer grado con cáncer de mama y el 90% de las mujeres consideraban la mamografía un estudio necesario para el diagnóstico temprano del cáncer de mama. Una sola mujer había tenido cáncer de mama. Se halló una relación inversa entre el nivel educativo y la edad de la primera mamografía ($p < 0.05$). Las mamografías

y ecografías mamarias no revelaron ninguna anomalía potencial. Se constató que las guías de detección de cáncer de mama argentinas no habían sido seguidas. Se pudo comprobar la homogeneidad en la alimentación y viviendas siendo la principal actividad económica está basada en la agricultura y la ganadería. La mayoría de las casas tienen una huerta donde se cultivan hortalizas y verduras. No hay servicio de agua de red sino que se obtiene de perforaciones de la napa; no hay red cloacal pero hay luz eléctrica y gas de garrafas. Hay un Centro de Atención Primaria que cuenta todos los días con una enfermera de 8 a 17 horas y un médico generalista tres días por semana. Respecto al acceso del sistema de salud, el 81% de las mujeres tenían algún tipo de seguro y el 19% no tenía obra social y utilizaba el sistema de salud público.

Conclusión: este estudio demostró peculiares características sociales y culturales que podrían ser relevantes para evaluar los factores de riesgo de cáncer de mama en Argentina.

Hasta nuestro conocimiento este es el primer estudio de estas características realizado en Argentina y en Latinoamérica.

Palabras clave: cáncer de mama, estudio regional, factores de riesgo, Argentina

Introducción

La incidencia del cáncer en el mundo difiere entre las regiones desarrolladas y las de menor desarrollo. Características demográficas, ambientales, culturales y genéticas constituyen variables relacionadas con la heterogeneidad de la incidencia del cáncer siendo muy poca la información de la mayoría de los países menos desarrollados (Matos, 1994) (Goss y otros 2013) (Ferlay y otros, 2010).

En Argentina se cuenta con registros parciales de cáncer; existen 13 registros poblacionales con diferentes niveles de desarrollo e

historia y un registro nacional basado en datos obtenidos de hospitales cuya información es centralizada por el Instituto Nacional del Cáncer, recientemente creado (www.msal.gov.ar). Se estima que en Argentina se diagnostican 17.000 casos nuevos de cáncer de mama por año siendo esta localización tumoral la causa de muerte más frecuente por cáncer en el sexo femenino con 5.400 muertes por año, lo que constituye la segunda tasa de mortalidad en Latinoamérica, después de Uruguay (Ferlay y otros 2010).

El aumento del riesgo de padecer cáncer de mama se ha asociado a múltiples factores tales como la edad, antecedentes familiares, exposición a hormonas femeninas (tanto endógenas como exógenas), sobrepeso y obesidad, factores dietéticos, factores relacionados con el estilo de vida, enfermedades mamarias benignas, densidad mamaria, historia reproductiva y factores ambientales (Freeman, 2005).

En la actualidad, en ausencia de medidas primarias efectivas, la mamografía es el método más ampliamente usado para la detección precoz del cáncer de mama; efectivamente, se ha comprobado que reduce la mortalidad y prolonga la vida (Freeman, 2005). En países desarrollados, la tasa de supervivencia a 5 años para el cáncer de mama detectado tempranamente ha ascendido a cerca del 95%, mientras que el pronóstico de las pacientes con enfermedad avanzada es pobre y la tasa de supervivencia a los 5 años es menor del 30% (Etzioni y otros 2003). En algunos países de Latinoamérica, se ha demostrado baja asistencia de las mujeres a la mamografía, hecho que también se ha descrito en mujeres latinas que viven en países diferentes al de su origen. En México, del 40% al 50% de las mujeres llegan a los servicios de mamografía con una masa palpable (Terán y otros, 2007). Las recomendaciones de la US Preventive Task Force consisten en una mamografía bi-anual para mujeres entre 50 a 74 años, mientras que la Sociedad Americana de Cáncer recomienda que las mujeres con riesgo promedio se hagan una mamografía a los 40 años. El Consenso Argentino para la Prevención del cáncer de mama recomienda una primera mamografía a los 35 años y, si fuera negativa, otra a los

40 y continuar con una mamografía bianual durante el período de vida sana.

Se han detectado grandes diferencias en los patrones de cáncer por región; es sabido que diferencias en la cosmovisión, así como en el concepto de salud y enfermedad influyen en las conductas preventivas respecto al cáncer de mama (Terán y otros, 2007), por lo cual la Asociación Internacional del Cáncer aconseja que deben establecerse prioridades regionales, nacionales y aún locales (Vineis, 2014). Por otra parte, los estudios mundiales con referencia al cáncer de mama y sus factores de riesgo se hacen en pacientes con cáncer pero son escasas las investigaciones en mujeres sanas.

Este trabajo de investigación se realizó para: 1- estudiar los factores de riesgo del cáncer de mama, 2- investigar las actitudes socio-culturales y los comportamientos en relación a la mamografía y 3- describir la incidencia de cáncer de mama en la totalidad de la población femenina en edad de riesgo de una comunidad rural de la provincia de Buenos Aires.

Sujetos y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo de noviembre de 2012 a enero de 2013. La característica de este estudio radicó en que comprendió a la totalidad de la población femenina (83 mujeres) de 40 a 75 años de edad que viven en Polvaredas, Partido de Saladillo, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Una vez obtenido el consentimiento informado de cada una de las mujeres incluidas en el estudio, trabajadoras sociales les realizaron una entrevista personal empleando una encuesta estructurada basada en Terán et al (Terán y otros 2007). Mediante esta encuesta se evaluaron 34 factores que incluyeron información demográfica y antropométrica, del sistema de salud, antecedentes personales y familiares acerca del cáncer de mama, historia reproductiva, hábitos

personales, conducta respecto a la salud, aspectos psicológicos y sociales, información acerca del cáncer de mama y estrategias preventivas, tratamientos de reemplazo hormonal.

Un mes después de haberse realizado la encuesta, se obtuvo una mamografía y/o una ecografía. En el caso de que alguna mujer se hubiera realizado una mamografía durante el año previo al estudio, se obtuvo el informe y la mamografía correspondiente.

El protocolo de investigación así como la encuesta utilizada fueron aprobados por el Comité de Ética local. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las pautas de la *18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y sucesivas enmiendas (www.wma.net)*.

Análisis de los datos

Se realizó un estudio descriptivo y se verificó la normalidad de las variables. Las diferencias entre los grupos fueron estudiadas empleando el ANOVA HSD Tukey; la asociación entre las variables se estudió mediante el test de χ^2 ($P < 0.05$).

Resultados

Características de Polvaredas

Polvaredas es un pueblo rural ubicado en el departamento de Saladillo a 185 Km. de la ciudad de Buenos Aires. La población de la zona urbana está compuesta por 390 habitantes cuya principal actividad económica está basada en la agricultura y la ganadería. La mayoría de las casas tienen una huerta donde se cultivan hortalizas y verduras. No hay sistema de agua de red sino que se obtiene de perforaciones de la napa; no hay red cloacal pero hay luz eléctrica y gas de garrafas.

En Polvaredas hay un Centro de Atención Primaria que cuenta todos los días con una enfermera de 8 a 17 horas y un médico generalista tres días por semana.

Factores de riesgo asociados al cáncer de mama (Tabla 1)

El promedio de edad de las mujeres fue de 54,55 años y la mayoría (>90%) tenían entre 40 y 65 años. El índice de masa corporal (IMC) promedio fue de 27,8 kg/m² (rango=19,8 a 36,7); el 31,3% de las mujeres eran obesas, aunque el 90% correspondían a obesidad de tipo I; el 13% tenía antecedentes familiares de cáncer de mama de primer grado (madre o hermana).

Sólo una mujer había sido previamente diagnosticada y tratada por cáncer de mama a los 35 años; ella había tenido su menarca a los 9 años y la menopausia a los 35 años. Tenía un solo hijo al que amamantó durante dos meses y entre sus antecedentes familiares de cáncer de mama constaba que su abuela lo había padecido así como otra familiar más alejada. Al momento de nuestra investigación tenía 52 años de edad y su IMC era de 26,11; consultaba a un médico que le indicaba una mamografía cada dos años. Asimismo, se constató que había terminado la escuela secundaria, estaba casada, era ama de casa y consideraba suficiente la entrada familiar; finalmente, se sentía suficientemente informada acerca del cáncer de mama y la mamografía.

La mayoría de las mujeres (79/83, 95%) había tenido uno o más hijos, con un promedio de 2,4 hijos por mujer (DS=1,42), alcanzado un valor máximo de 10 en una observación. Asimismo, la mayoría de las mujeres (82%) habían amamantado y el 65% por al menos 12 meses; sólo 14 mujeres no habían amamantado, 4 de las ellas porque no habían tenido hijos.

En cuanto al uso de tóxicos, fueron evaluados tanto el consumo de tabaco como el de alcohol, comprobándose que ambos eran muy bajo (Tabla 1).

Características socio-económicas (Tabla 2)

El 60% de las mujeres estaban casadas o en pareja y el 63% eran amas de casa. Subjetivamente ellas evaluaron la entrada familiar como “suficiente” o “insuficiente” y el 73,5% consideró que era “suficiente.”

Considerando el ítem “educación”, 28/82 mujeres (34%) habían terminado al menos la escuela secundaria; cuando se correlacionó el nivel educativo con la edad, se encontró que las mujeres más jóvenes tenían niveles más elevados de educación mostrando una tendencia estadística, aunque no significativa, $p < 0,05$.

Respecto al acceso del sistema de salud, el 81% de las mujeres tenían algún tipo de seguro y el 19% no tenía obra social y utilizaba el sistema de salud público.

Actitudes frente al cáncer de mama y mamografía

Antecedentes mamográficos

El 81% ($n=67$) de las mujeres encuestadas respondió haberse realizado al menos una vez un estudio mamográfico. Cerca del 50% había realizado su primer control mamográfico antes de los 40 años mientras que el 42%, entre los 40 y 50 años y el 8% restante después de los 50 años. El 61% de las mujeres tenía una última mamografía en un período menor de 2 años respecto a este estudio.

Se halló una relación significativa ($p < 0,05$) entre edad y primera mamografía hallándose que las mujeres de más edad comenzaban sus controles más tardíamente.

Información acerca del cáncer mama y la mamografía (Tabla 3)

Se observó que el 93% consideraba a la mamografía un estudio necesario para el diagnóstico temprano de cáncer mama mientras que el 60% consideraba que tenía suficiente información acerca del cáncer de mama.

Interés respecto al seguimiento y prevención

Las mujeres fueron interrogadas acerca de la información que consideraban importante de ser incluida en el informe mamográfico; la mayoría (83%, n=69) consideraron que sería interesante adjuntar información acerca de los procedimientos mamográficos y sus resultados así como sobre el cáncer de mama (81%, n=67).

Por otra parte, un 78,3% de las mujeres encuestadas consideró que le gustaría recibir un llamado telefónico para recordarle que se aproxima la fecha en que debe realizar su control mamográfico. Sólo 6 mujeres desearían información acerca de una página de internet de referencia (en Polvaredas no hay internet).

Finalmente, el 57% de las mujeres consultaban a un médico clínico regularmente.

Estudios mamográficos

Se obtuvieron datos mamográficos en 66 mujeres de las 83 encuestadas; en 57/66 se realizó una mamografía nueva durante nuestra investigación mediante el mamógrafo móvil del Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires; las otras 9 presentaron su última mamografía debido a que ésta había sido realizada durante el transcurso del último año respecto al estudio.

Todos los estudios fueron evaluados por la misma especialista (M.M. Martinucci).

Se consideraron los siguientes datos mamográficos: tipo de mama, presencia de nódulos, presencia de microcalcificaciones anárquicas, axila, Bi-rads (Breast Imaging Report and Database System) (Tabla 4).

En base a los datos mamográficos, se completó el estudio imagenológico con ecografías mamarias en 20 mujeres mientras que en 3 mujeres la mamografía no fue posible de realizar debido a las carac-

terísticas de las mamas y/o la presencia de implantes mamarios; no se observó ninguna anomalía en ningún caso.

El estudio mamográfico fue relacionado con los datos obtenidos por la encuesta y se realizó un estudio comparado entre dos grupos (con y sin estudio mamográfico) y no se halló ninguna diferencia significativa en ninguno de los parámetros considerados ($p < 0,05$).

Discusión

Se realizó un trabajo de investigación en la población de una pequeña localidad rural de la Argentina con el objeto de recabar datos en relación a las estrategias preventivas y a las características epidemiológicas del cáncer mamario. La localidad de Polvaredas fue elegida por diversos motivos; por una parte, es una de las tantas poblaciones con las características típicas de las comunidades rurales pequeñas de la provincia de Buenos Aires; por otra parte, porque no posee ningún tipo de registro de cáncer, y, finalmente, debido a que las autoridades municipales consideraron que el estudio sería una muy importante contribución para la población.

Se ha establecido que los factores de riesgo y los registros de cáncer revelan la heterogeneidad geográfica y tendencias, que con el tiempo generan diversas hipótesis etiológicas (Vineis, 2014). Asimismo, los registros son cruciales para planificar las campañas de prevención y comprender sus resultados, incluidas las pruebas de testeo al azar en las comunidades y las campañas planificadas de salud pública. Es un hecho conocido que en muchos países esos registros no existen o son inadecuados, especialmente en regiones en desarrollo (Vineis, 2014).

En el presente estudio se empleó una encuesta basada en la realizada por Terán et al. (Terán y otros, 2007); las preguntas incluyeron diversos aspectos socio-culturales, así como factores de riesgo de cáncer de mama. Entre ellos se incluyó tener una historia familiar de cáncer mamario ya que es sabido que particularmente en mujeres

con familiares en primer grado de consanguinidad (madre, hermana, hija) que lo hayan padecido puede duplicar el riesgo de tenerlo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). En Polvaredas solo una mujer padecía cáncer de mama, mientras cerca del 13% tenía parientes de primer grado de consanguinidad con cáncer mamario, lo cual está de acuerdo con las estadísticas globales (Easton, 2002).

La terapia de reemplazo hormonal fue un hallazgo infrecuente en la localidad en estudio; en este sentido, hasta el presente, el uso por tiempo prolongado de esta terapia ha sido asociado con el riesgo más alto, el cual parece depender también de ser pre o postmenopáusica tenerlo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). El estado reproductivo ha sido asociado a riesgo de cáncer mamario, y se considera que las nulíparas tienen un mayor riesgo que las mujeres que han tenido hijos (RR de 1,2 a 1,7) (Kelsey, 1993) (Stuebe, 2009); los datos obtenidos en Polvaredas muestran que menos de 5% de las mujeres eran nulíparas.

En relación con la lactancia, más del 80% de las mujeres de Polvaredas habían amamantado, comparado con el 41% que es la cifra promedio de la población de la provincia de Buenos Aires. Más aún, cerca del 65% de las mujeres de Polvaredas habían amamantado por un período de 12 meses o más con un valor promedio de 10 meses, comparado con el de la provincia de Buenos Aires que es de 8,9 meses. En muchos estudios se ha observado un efecto protector del amamantamiento, el cual depende de su duración (tenerlo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002)). En un extenso análisis que incluye datos individuales de 47 estudios epidemiológicos (más de 146.000 mujeres entre casos y controles) se estimó que, por cada 12 meses de amamantamiento, hay un 4,3% en la reducción del riesgo de contraer cáncer mamario (Zheng y otros, 2001).

Con respecto al consumo de alcohol y al hábito tabáquico, se hallaron diferencias entre los resultados obtenidos en Polvaredas y los de Argentina en general; mientras que en la primera se detectó un

bajo consumo, a nivel nacional es mucho más elevado. En relación al consumo de tabaco, los datos nacionales indican que fuman el 23,9% y el 15,9% de los hombres y las mujeres, respectivamente mientras que ninguna de las mujeres de Polvaredas fuma más de 10 paquetes de cigarrillos por año. Aunque los resultados han variado, extensos estudios sugieren que los fumadores tienen un bajo aumento en el riesgo de cáncer de mama (Cui, 2006) (Gaudet y otros, 2013) mientras otras investigaciones sugieren lo opuesto (Al-Delaimy y otros, 2004) (Bagnardi y otros 2013). Por otra parte, un meta-análisis incluyendo 110 estudios epidemiológicos realizado en el 2013 mostró una pequeña pero significativa asociación entre el cáncer de mama en la mujer y el bajo consumo de alcohol (RR 1,05, 95% CI 1,02-1,08) (22). En las mujeres de Polvaredas, el consumo de alcohol no excedió los 5 g/día.

La obesidad (definida como $IMC \geq 30$ kg/m) se asocia con un incremento en la morbilidad y en la mortalidad. Sin embargo, el riesgo de cáncer de mama asociado al IMC parece ser depender del estado de menopausia de la mujer. Un alto IMC y/o suba de peso ha sido asociado con un riesgo más alto de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Feigelson y otros, 2004) (Tabàr y otros, 2001). Más del 27% de las mujeres argentinas tienen exceso de peso; las mismas cifras encontramos en Polvaredas (30%).

La mamografía es la principal herramienta para la detección temprana del cáncer de mama debido a que es el único método que ha probado que disminuye la mortalidad relacionada con el cáncer de mama (Tabàr y otros, 1992). La mamografía permite detectar un cáncer un año y medio a 4 años antes de que sea clínicamente evidente (De Maio, 2012). El 62% de las mujeres mayores de 40 años de Polvaredas encuestadas tenían una mamografía en los dos años previos al estudio; esta cifra es mayor a la de nuestro país en general (54,2%) y también mayor a la provincial (56,3%) (provincia de Buenos Aires). A pesar de todo, en ningún caso, las mujeres argentinas cumplen con las indicaciones del Consenso Argentino. En Polvaredas, el 80% se

habían hecho una mamografía en su vida y sólo el 32,5% se habían hecho su primera mamografía antes de los 40 años de edad.

En relación con la educación, la cual es también un indicador del status socio-económico, en esta investigación se incluyeron las siguientes categorías: escuela primaria incompleta, escuela primaria completa, escuela secundaria incompleta, escuela secundaria completa, terciaria/universitaria. En Polvaredas se observó que las mujeres menores de 40 años con mayor nivel educativo tenían una mayor concurrencia a la mamografía (Figura 1). Asimismo, cerca del 80% de las mujeres de Polvaredas tenían alguna cobertura de salud; más del 70% consideraban suficiente la entrada económica de su familia y el 57% tenían un médico clínico.

Por otra parte, en Polvaredas, casi todas las mujeres consideraron a la mamografía como necesaria y al cáncer de mama como una enfermedad curable cuando se detecta tempranamente; más aún, la mayoría de las mujeres se consideraron informadas acerca del cáncer de mama y a más del 75% les gustaría recibir un llamado telefónico alertándolas de la proximidad del control mamográfico.

Es preciso que se profundice el estudio de las razones por las cuales algunas regiones tienen una menor incidencia del cáncer de mama que otras. Nosotros encontramos que las diferencias educativas juegan un rol. Más aún, Polvaredas se presenta como una localidad con ciertas características especiales ya que la mayoría de las mujeres están casadas o en pareja, han tenido hijos y los han amamantado, tienen cobertura de salud, consideran suficiente la entrada económica del hogar, su dieta no incluye comidas rápidas y viven en una tranquila y pequeña localidad rural. Los factores de riesgo que podrían modificarse incluirían la disminución del peso y la actividad física.

Esta investigación fue realizada en una pequeña población pero existen muchas otras comunidades similares en una igual o parecida situación sanitaria y sabemos que otras áreas geográficas de Argentina presentan características diferentes.

Nuestro estudio tiene limitaciones pero consideramos que es el primero de estas características realizado en Argentina y, hasta nuestro conocimiento, en Latinoamérica.

Llegamos a la conclusión de que el estilo de vida, las características familiares así como una inclinación positiva al cuidado de la salud de estas mujeres rurales ayudarían a mejorar la detección temprana del cáncer de mama y una simple estrategia preventiva podría ser fácilmente organizada.

Bibliografía

1. Matos, E. L., Loria, D.I., Vilensky, M. (1994). Cancer mortality and poverty in Argentina: a geographical correlation study. *Cancer Ep, Biomarkers and Prev* 3:213-218.
2. Goss, P.E. , Lee, B.L., Badovinac-Crnjevic, T. y otros (2013). Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *The Lancet* 14:391-436.
3. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F. y otros.(2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917.
4. Freeman, H. y Chu, K. (2005). Determinants of cancer disparities: barriers to cancer screening, diagnosis, and treatment. *Surg Oncol Clin N Am* 14:665-669, 2005.
5. Wang, F.-L., Chen, F., Yin, H. y otros (2014). Effects of Age, Breast Density and Volume on Breast Cancer Diagnosis: A Retrospective Comparison of Sensitivity of Mammography and Ultrasonography in China's Rural Areas. *Asian Pacific J Cancer Prev* 14:2277-2282.
6. Etzioni, A., Urban, N., Ramsey, S. y otros. (2003). The case of early detection. *Nat Rev Cancer* 3:243-252.
7. Terán, L., Baezconde-Garbanati, L., Marquez-Holmberg, M. y otros. (2007). On time mammography with focus on Latinas with

- low income: a proposed cultural model. *Anticancer Res* 27:4325-4338.
8. Vineis, P. y Wild, C.P. (2014) Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet* 8:549-557, 2014.
 9. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 358:1389-1399.
 10. Easton, D. F. (2002). Family risks of breast cancer. *Breast Cancer Res* 4:179-181.
 11. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350:1047-1059.
 12. Kelsey, J.L., Gammon, M. D., John, E. M. (1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15:36-47.
 13. Stuebe, A. M., Willett, W. C., Xue, F. y otros. (2009) Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med* 169:1364-1371.
 14. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 360:187- 195.
 15. Zheng, T., Holford, T. R., Mayne, S.T. y otros (2001) Lactation and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. *Br J Cancer* 84:1472-1476.
 16. Reynolds, P., Hurley, S., Goldberg, D. E. y otros. (2004). Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study. *J Natl Cancer Inst* 96:29-37.

17. Cui, Y., Miller, A.B., Rohan, T. E. (2006). Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 100:293-299.
18. Gaudet, M. M., Gapstur, S. M., Sun, J. y otros. (2013) Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 105:515-525.
19. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002) Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 87:1234-1245.
20. Al-Delaimy, W. K., Cho, E., Chen, W. Y. y otros. (2004). A prospective study of smoking and risk of breast cancer in young adult women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:398-404.
21. Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E. y otros. (2013). Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 24:301-308.
- van den Brandt, P. A., Spiegelman, D., Yaun, S.S. y otros (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 152:514-527.
22. Feigelson, H.S., Jonas, C. R., Teras, L. R. y otros. (2004). Weight gain, body mass index, hormone replacement therapy, and postmenopausal breast cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:220-224.
23. Tabàr, L., Vitak, B., Chen, H. H. y otros. (2001). Beyond randomized controlled trials: organized mammographic screening substantially reduces breast carcinoma mortality. *Cancer* 91:1724-1731.
24. Tabàr, L., Fagerberg, G., Duffy, S. W. y otros (1992). Update of the Swedish two-county program of mammographic screening for breast cancer. *Radiol Clin North Am* 30:187-210.
25. De Maio, F. G., Linetzky, B., Ferrante, D. (2012). Changes in the social gradients for Pap smears and mammograms in Argentina:

Evidence from the 2005 and 2009 National Risk Factor Surveys.
Public Health 126: 821-826.

Tabla 1. Factores de riesgo de cáncer de mama

Características	Categorías	% (n=83)
Edad (años)	40-49	37.4 (31)
	50-59	28.9 (24)
	60-69	28.9 (24)
	70-75	4.8 (4)
IMC (kg/m ²)	19-24,99	30,12
	25-29,99	38,55
	30-34,99	27,71
	35 o más	3,61
Antecedentes personales de cáncer de mama	Si	1,2
	No	98,8
Historia familiar de cáncer de mama (n=29, 35%)	De primer grado (madre y/o hermana)	38
	Otros	62
TRH	Si	7,22
	No	92,88
Hijos vivos	0	4.8 (4)
	1-3	81.9 (68)
	4-6	12.1 (10)
	>7	1.2 (1)
Lactancia	Yes	83,13 (69)
	No	16,87 (14)

Meses de lactancia	0	16.9 (14)
	1-12	28.9 (24)
	12-24	26.5 (22)
	24-36	13.3 (11)
	>36	14.4 (12)
Edad de la menarca	<10	6.0 (5)
	10-14	86.7 (72)
	>14	7.3 (6)
Menopausia	Si	65,06
	No	34,94
Edad de la menopausia	<45	16.7 (9)
	45-55	79.6 (43)
	>55	3.7 (2)
Tabaco	<10 paquetes/año	100
	>10 paquetes/año	0
Alcohol	<5 g/día	100
	>5 g/día	0

Tabla 2. Características socio-económicas

Características	Categorías	% (n=83)
Estado civil	Casada o en pareja	72,29
	Soltera	3,61
	Separada o divorciada	9,64
	Viuda	14,46

Ocupación	Ama de casa	77,11
	Trabajo	21,69
	Desempleada	1,2
Ingresos*	Suficientes	73,49
	Insuficientes	26,51
Cobertura de Salud	Obra social	80,72
	Sin obra social	19,28
Educación (n=82)	Primaria incompleta	20,73 (17)
	Primaria completa	41,46 (34)
	Secundaria incompleta	3,66 (3)
	Secundaria completa	24,39 (20)
	Terciario o Universitario	9,76 (8)

*subjeto

Tabla 3. Conocimiento del cáncer mama y la mamografía

Características	Categorías	% (n=83)
¿Ha leído sobre el cáncer de mama?	Sí, mucho	66,27
	Un poco	2,41
	Ocasionalmente/Raramente	27,71
	Nunca	3,61
¿Se siente informada acerca del cáncer de mama?	Sí	67,47
	Un poco	24,10
	Muy poco/No	8,43

¿Considera que el cáncer de mama es curable en estadios tempranos?	Sí	92,77
	No	1,21
	No sé	6,02
¿Considera que la mamografía es necesaria?	Sí	92,77
	No	7,23

Tabla 4. Características mamográficas obtenidas en 66 mujeres

Características		Número
Tipo de mama	Fibro-glandular	62
	Fibro-nodular	1
	Fibro-lipomatoso	3
Nódulos	Sí	54
	No	12
Microcalcificaciones anárquicas	Sí	0
	No	66
Ganglios linfáticos axilares	No presentes	18
	Inespecíficos	24
	Sospechosos	3
Bi-rads	0	18
	1	26
	2	22
	>3	0

Metástasis cutáneas de cáncer de mama

Luna, Amalia

Resumen

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasias sólidas en el sexo femenino. Las metástasis cutáneas de neoplasias internas constituyen un hecho infrecuente, con una incidencia global de 5.3%. La principal causa de metástasis en piel en el sexo femenino es el cáncer de mama, con una incidencia de 23.9%. Dentro de las moléculas implicadas en la diseminación tumoral se destacan la MUC1 y glicanos asociados.

Esta investigación tiene por objetivo establecer la posible implicancia de MUC1, uMUC1 y los antígenos carbohidratos asociados en la diseminación metastásica cutánea del cáncer de mama.

Palabras clave: cáncer de mama, metástasis cutáneas, uMUC1, sialyl Lewis x

Introducción

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasias sólidas en el sexo femenino. Su prevalencia es de 12%, con una tasa de 40% de muertes por enfermedad metastásica (Howlader y otros, 2011).

Las metástasis cutáneas de neoplasias internas constituyen un hecho infrecuente, con una incidencia global de 5.3%. La principal causa de metástasis en piel en el sexo femenino es el cáncer de mama, con una incidencia de 23.9% (Krathen, 2003).

MUC1 es una glicoproteína transmembrana que se expresa tanto en tejido normal como en células epiteliales de tumores benignos y malignos (McGuckin y otros 1995) (Croce, 1997). MUC1 se traduce como un polipéptido, el cual es dividido en dos subunidades: el ectodominio (MUC1-N) y la cola citoplásmica (MUC1-C); ellas forman un heterodímero estable en la membrana apical de las células epiteliales normales. Luego de la transformación maligna, MUC1 se sobreexpresa, sufre glicosilación aberrante y pueden observarse distintas variantes de *splicing* de su ARNm. En estos casos, puede hallarse en toda la membrana plasmática y en el citosol, perdiendo, asimismo, su expresión apical, característica de los epitelios normales (Croce, 1997) (Hilkens, 1995). Tanto el ectodominio como la cola citoplásmica de MUC1 participan de la transformación

maligna y progresión metastásica en el cáncer de mama. La cola citoplásmica interactúa con la mitocondria y el núcleo, donde activa las vías Wnt/ b-catenina, el transductor de señales y activador de transcripción (STAT) y el factor nuclear kB (NFkB). Asimismo, MUC1 se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ErbB2 y otros receptores tirosina-kinasa a nivel de la membrana celular, contribuyendo a la activación de las vías PI3K-AKT y proteína-kinasa activadora de mitógenos (MAPK). Estas interacciones, promueven un fenotipo invasor en la tumorigénesis (Cazet y otros 2010).

El dominio extracelular de MUC1 presenta una zona compuesta por un número variable de repeticiones en tándem (VNTR). Cada

tándem consiste en una secuencia de veinte aminoácidos los cuales contienen cinco sitios Ser y Thr de *O*-glicosilación potencial. El epitelio normal presenta largas cadenas de carbohidratos, pero luego de la transformación maligna, se produce una hipoglicosilación aberrante (uMUC1), obteniendo oligosacáridos acortados como Tn, T y del grupo Lewis, así como sus derivados sialilados (Lloyd y otros 1996).

El proceso por el cual se producen metástasis a distintos sitios, como hueso, pulmón, hígado y cerebro ha sido investigado en profundidad, sin embargo, no hay estudios acerca del proceso metastásico a la piel.

En el presente estudio, establecemos la posible implicancia de MUC1, uMUC1 y los antígenos carbohidratos asociados en la diseminación metastásica cutánea del cáncer de mama.

Materiales

Se estudiaron 140 tacos parafinados provenientes de 101 pacientes de sexo femenino con diagnóstico histológico de cáncer de mama.

Las muestras de origen humano fueron obtenidas siguiendo las directrices de la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki (Finlandia, 1964). Asimismo, el uso de muestras de origen humano fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, mediante la carta de aprobación del protocolo de referencia N°0800-017399/13-000.

De las 101 pacientes incluidas, 30 presentaban diagnóstico comprobado histológicamente de metástasis cutáneas (MC) de cáncer de mama de las cuales se estudiaron los tacos parafinados del tumor primario (N=26), ganglios axilares (N=13) y metástasis cutáneas (N=30), obtenidos del Hospital Provincial de Neuquén Dr. Eduardo Castro Rendón (Neuquén Capital, Provincia de Neuquén).

Se incluyeron como grupo control los tacos parafinados del tumor primario de 71 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama

que no desarrollaron metástasis en piel en un seguimiento de 10 años luego del diagnóstico del tumor primario. Los tacos incluidos como controles fueron obtenidos en la Clínica Breast (La Plata, Provincia de Buenos Aires).

En ambos grupos se estudiaron las características histológicas del tumor, expresión de receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y factor de crecimiento Her2 neu.

Se excluyeron del estudio aquellas pacientes que histológicamente presentaran compromiso en piel por invasión directa del tumor subyacente.

Líneas celulares

Se cultivaron células de cáncer de mama ZR-75-1 en medio RPMI-1640 (SIGMA, USA) a 37°C, 5% CO₂.

Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales anti-MUC1: anti-MUC1 (HMFG1 MAb) y anti-uMUC1 (SM3 MAb), anti-sLex (KM93 MAb), anti-Lex (KM380 MAb), anti-Tn y anti-TF.

Métodos

Análisis Inmunohistoquímico (4)

Se realizaron cortes seriados de los tacos parafinados en micrótopo en un espesor de 5 µm y fijación en portaobjetos. Posteriormente fueron desparafinados en xilol y rehidratados en soluciones de alcohol en concentración decreciente (100%, 95%, 70%, 50%). Se realizaron dos lavados en solución buffer PBS (*phosphate buffer saline*) pH

7.4. Para la recuperación antigénica las muestras fueron tratadas en buffer citrato 10 mM pH 6 en horno microondas durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados en PBS y posteriormente el bloqueo de la peroxidasa endógena en solución de peróxido de hidrógeno 0.3% en metanol durante 15 minutos. Luego de dos lavados en PBS, los cortes fueron incubados durante 30 minutos en suero equino 10% a temperatura ambiente a fin de bloquear las uniones no específicas del anticuerpo primario. Posteriormente los cortes fueron lavados en PBS e incubados con el anticuerpo monoclonal primario durante 1 hora en cámara húmeda. Luego del lavado en PBS, para la detección del anticuerpo primario las muestras fueron incubadas en cámara húmeda con el kit Dako (*LSAB+SystemHRP*, Dako, Dinamarca) según instrucciones del fabricante. Se realizaron dos lavados en PBS y luego incubación en solución de 3,3'-diaminodiazobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen System*, Dako, Dinamarca) durante 15 minutos. Se realizaron tres lavados en PBS y posteriormente tinción de hematoxilina (Sigma, EEUU) durante 3 minutos. Deshidratación en tren de alcoholes en concentración creciente (50%, 70%, 95%, 100%), xilol y montaje con bálsamo de Canadá y cubreobjetos.

Los controles negativos fueron incubados con PBS en lugar de anticuerpo monoclonal.

Las muestras fueron evaluadas en microscopio óptico por 2 observadores separadamente.

La reacción de inmunohistoquímica se consideró positiva cuando se observó tinción mayor al 5% de las células tumorales. La intensidad de la reacción se clasificó en tres grupos: débil (+), moderada (++) e intensa (+++). El patrón de reacción se clasificó en: lineal (reacción localizada en la membrana), citoplásmico (reacción en citoplasma), mixto (reacción en membrana y citoplasma) y nuclear.

Separación de fracciones subcelulares (Croce y otros, 2004)

Se separaron las fracciones subcelulares de las células de líneas celulares de cultivos en confluencia y cortes de tejido. Se homogeneizaron las células y tejidos, se separaron las fracciones subcelulares por centrifugación diferencial a 600xg obteniéndose un primer precipitado que fue descartado y un sobrenadante que se centrifugó a 105000xg a 4°C obteniéndose fracciones citoplásmica y de membrana.

Para los ensayos de células en cultivo se retiró el medio de cultivo y se lavó tres veces la monocapa con PBS a 4°C; posteriormente, se colocó 400 uL del buffer de lisis en un frasco T25. El buffer de lisis utilizado fue: TRIS HCl 50 mM pH 7.8 con NP40 1% o Triton X100 más inhibidores de proteasas, 20 uL por cada 2 mL de buffer. Se dejó 30 minutos a 4°C en agitación; se pasó un scrapper y se juntó el material en el fondo del frasco con pipeta. Se pipeteó varias veces para desarmar el agregado de células. Luego se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Se midió la concentración de proteínas, se alicuotó y almacenó a -20°C.

Con el objeto de analizar la posible presencia de antígenos carbohidratos en las mucinas, las fracciones subcelulares se inmunoprecipitaron con distintos anticuerpos monoclonales. Luego se procedió a incubarlas a Proteína A- Sepharosa CL4B por el anticuerpo y se eluyeron los antígenos unidos a los anticuerpos (complejos inmunes).

El protocolo de inmunoprecipitación con anticuerpos en solución utilizado fue el siguiente: en un tubo para microcentrifuga se colocó 10-50 ug de lisado celular junto con el anticuerpo (4uL de antisuero policlonal, 100 uL de sobrenadante de cultivo); se incubó la muestra con el anticuerpo durante 12 hs a 4°C en medio de agitación. Se unió a 400 mL de proteína A-Sepharosa CL-4B, 70-100 uL de cada muestra en hielo, incubándose en agitación por 4 horas. Se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se lo desechó. Se lavó centrifugando con buffer de lavado 3 veces y luego se eluyó con buffer Tris/HCl pH 3.5.

SDS/PAGE e Inmunoblotting

Se analizaron los complejos inmunes empleando técnicas estándar de SDS-PAGE en geles discontinuos de distinto porcentaje de poliacrilamida. Asimismo, se procedió a la transferencia membranas de nitrocelulosa y su revelado mediante el empleo de la técnica de quimioluminiscencia. Finalmente, se realizó el análisis de imágenes empleando programas informáticos.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico diferenciando según el tipo de tumor primario (con o sin metástasis cutánea). Clasificación según la expresión de receptores de estrógeno, progesterona, Her2neu, y las características histológicas del tumor tales como diferenciación histológica y grado nuclear.

Correlaciones entre la expresión de MUC1 y antígenos carbohidratos mediante el coeficiente de Kendall's tau-b. Comparación entre los grupos mediante el test de Chi cuadrado. Significación estadística $p < 0.05$.

Los análisis se realizaron empleando el programa SPSS statistics v24.0 software package.

Resultados

Tumores primarios con metástasis cutáneas

Las muestras correspondientes a tumores de mama con metástasis cutáneas eran en su mayoría de grado histológico 3 (N=21; 81%) y grado nuclear 3 (N=23; 88%). Con respecto a la expresión de receptores hormonales, en 10 tumores (38.5%) se observaron receptores negativos (RE-, RP-, Her2-), 3 tumores eran RE+RP+Her2+, 3 casos RE-, RP-, HER2+ y 6 tumores eran RE+, RP+, Her2-.

Se detectó invasión vascular o linfática en 8 tumores en tinción con hematoxilina-eosina. Para su observación más adecuada se realizaron tinciones para vasos sanguíneos (CD31 MAb) y linfáticos (D2-40).

De los 26 tumores primarios que dieron metástasis cutáneas, 25 (96.2%) expresaban HMFG1, 24 (92.3%) expresaban SM3, 11 (42.3%) expresaban sLex, 14 (53.8%) fueron positivos para Lex, 10 (38.5%) fueron positivos para Tn y se observó positividad para TF en 1 caso (3.8%).

Metástasis cutáneas

Se estudiaron 30 tacos histológicos de metástasis cutáneas de cáncer de mama, de las cuales en 21 casos se analizó también el tumor primario que originó la metástasis.

Con respecto a los receptores hormonales, 8 (38.1%) fueron positivas para RE, 6 (28.57%) fueron positivas para RP y 2 (8.7%) fueron positivas para Her2neu.

En cuanto a MUC1 y los antígenos carbohidratos asociados, de las 30 metástasis cutáneas estudiadas, 30 (100%) fueron positivas para HMFG1, 20 (66.6%) fueron positivas para SM3, 13 (43.3%) fueron positivas para sLex, 14 (46.6%) fueron positivas para Lex, 15 (50%) fueron positivas para Tn y 2 (6.6%) fueron positivas para TF.

Análisis comparativo tumores primarios con *versus* sin metástasis cutáneas

Se estudiaron los tacos histológicos de 71 tumores primarios de cáncer de mama, los cuales no desarrollaron metástasis cutáneas, como grupo control. De los 71 tumores primarios de mama que no presentaron metástasis cutáneas, 55 (77.5%) expresaban receptor de estrógenos, 51 (71.7%) eran positivos para el receptor de progesterona, y 6 (8.4%) expresaban Her2neu (Tabla 1).

Con respecto a la expresión de MUC1 y antígenos carbohidratos asociados, se evidenció una diferencia significativa en la expresión de uMUC1 (SM3 MAb) y sLex (Tabla 2).

Discusión

Nuestros resultados demuestran que tanto uMUC1 como sLex se encuentran altamente sobreexpresados en tumores primarios de mama que desarrollaron metástasis cutáneas, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a aquellos tumores primarios de mama que no presentaron metástasis cutáneas.

Asimismo, se aisló uMUC1 de una lesión de metástasis cutánea con un peso molecular aproximado $>200\text{kDa}$, el cual fue el sitio de unión de KM93 (anti-sLex MAb).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que uMUC1 sería el carrier de sLex, y podrían estar implicados en las metástasis cutáneas de cáncer de mama.

Otros autores han encontrado que MUC1 puede ser un carrier de antígenos Lewis, así como de otros glicanos (Lloyd y otros 1996) (Geng, 2012).

Es conocido, que la diseminación metastásica a través del torrente sanguíneo se inicia mediante la invasión de las células tumorales a los vasos sanguíneos del tumor primario, luego la adherencia de las mismas a la pared endotelial y la posterior extravasación y formación de un segundo nicho tumoral. Esta adherencia transitoria se produce a través de interacciones entre la célula tumoral y el endotelio activado, y uno de los mecanismos de interacción es mediante el antígeno sLex expresado en la célula tumoral y las selectinas expresadas por el endotelio o en células inmunes circulantes (St Hill, 2011).

Las células tumorales de cáncer de mama que expresan uMUC1 como carrier de sLex alcanzarían la circulación, accediendo posteriormente a la piel.

En nuestro estudio observamos que los tumores primarios con metástasis cutáneas fueron con mayor frecuencia negativos para RE con respecto a aquellos tumores primarios que no desarrollaron metástasis cutáneas.

Julien et al (2011) (Julien y otros, 2011) comunicaron que sLex se encontraba sobreexpresado en los tumores de mama RE negativos con respecto a los tumores RE positivos, y observaron que la adherencia a las células endoteliales era más eficiente cuando sLex era llevado por glicoproteínas que cuando se encontraba en glicolípidos.

Conclusión

En nuestro estudio con tumores primarios de cáncer de mama que desarrollaron metástasis cutáneas pudimos observar mayor grado histológico y nuclear y menor expresión de receptores hormonales, características relacionadas con una mayor agresividad biológica. Asimismo, observamos mayor expresión de uMUC1 y sLex en los tumores con metástasis cutáneas con respecto a los tumores primarios sin metástasis cutáneas.

Estos hallazgos nos permiten establecer el posible rol de MUC1 y sLex en el desarrollo de metástasis cutáneas de cáncer de mama.

Bibliografía

1. Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., y otros. (2011) SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute.
2. Krathen, R.A., Orengo, I. F., Rosen, T. (2003) Cutaneous Metastasis: A Meta-Analysis of Data. *South Med J*; 96: 164-7.
3. McGuckin, M. A., Walsh, M. D., Hohn, B. G. y otros (1995) Prognostic Significance of MUC1 Epithelial mucin expression in breast cancer. *Human Pathol* 26: 432-439.
4. Croce, M. V., Colussi, A. G., Price, M. R., Segal-Eiras, A (1997) Expression of tumour associated antigens in normal, benign and malignant human mammary epithelial tissue: a comparative immunohistochemical study. *Anticancer Res*;17:4287-4292.

- 5- Hilkens, J., Vos, H..L.Wesseling, J. y otros (1995) Is episialin/MUC1 involved in breast cancer progression? *Cancer Letters*; 90: 27-33
6. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M. y otros (2010) Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res.*; 12:204-216.
7. Lloyd, K.O., Burchell, J., Kudryashov, V. y otros (1996).Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines–demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumour cells. *J. Biol. Chem.* 271, 33325–33334.
- St Hill, C.A. (2011) Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosc-i* (Landmark Ed) 16:3233-3251.
8. Croce, M. V., Isla-Larrain, M., Tur, R. y otros. (2004) Antigenic differences between metastatic cells in bone marrow and primary tumours and the anti-MUC1 humoral immune response induced in breast cancer patients. *Clinical & Experimental Metastasis*, 21:139-47.
9. Geng, Y., Yeh, K., Takatani, T., King, M.R. (2012) Three to tango: MUC1 as a ligand for both E-selectin and ICAM-1 in the breast cancer metastasis cascade. *Front Oncol.*; 2:76.
10. St Hill, C.A. (2011) Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosc-i* (Landmark Ed) 16:3233-3251
11. Julien, S., Ivetic, A., Grigoriadis, A. y otros (2011) Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res* 71: 7683-7693.
12. St Hill, C.A. (2011) Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosc-i* (Landmark Ed) 16:3233-3251

Receptor	Tumores primarios con metástasis cutáneas	Tumores primarios sin metástasis cutáneas	Chi-cuadrado Significancia (p)
RE	11 (42.3%)	55 (77.5%)	0.002
RP	11 (42.3%)	51 (71.7%)	0.012
Her2 neu	7 (26.9%)	6 (8.4%)	0.018

Tabla 1: Expresión de receptores hormonales en tumores primarios con vs tumores primarios sin metástasis cutáneas.

Anticuerpo (IHQ)	Tumores primarios con metástasis cutáneas	Tumores primarios sin metástasis cutáneas	Chi-cuadrado Significancia (p)
HMFG1	25 (96.2%)	66 (93%)	0.56
SM3	24 (92.3%)	34 (47.9%)	0.000
sLex	11 (42.3%)	15 (21.1%)	0.037
Lex	14 (53.8%)	42 (59.2%)	0.63
Tn	10 (38.5%)	34 (47.9%)	0.40
TF	1 (3.8%)	13 (18.3%)	0.07

Tabla 2: Expresión de MUC1 y antígenos asociados en tumores primarios con vs tumores primarios sin metástasis cutáneas.

Progresión del cáncer de mama

Martín Carlos Abba

Introducción

Etiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial que puede desarrollarse como resultado de las interacciones entre factores genéticos, ambientales y hormonales (Figura 1). Entre los factores endocrinos y reproductivos asociados con un incremento del riesgo de desarrollo de cáncer de mama se pueden mencionar: menarca precoz, nuliparidad, edad madura del primer embarazo, y menopausia tardía. Los factores ambientales asociados con un riesgo incrementado de desarrollo de cáncer de mama incluyen: las dietas ricas en grasas, el consumo excesivo de alcohol, la exposición a radiación, y la exposición a químicos.

De esta manera, la constitución genética sumado a la influencia de los múltiples factores endógenos y exógenos, es lo que en última instancia determinará el riesgo específico de cada mujer de desarrollar cáncer de mama. La variabilidad genética (Ejemplo: SNPs, CNVs, etc.) encontrado en la población general explica en parte porque ciertos individuos desarrollan cáncer mientras que otros no, incluso

cuando son expuestos durante el mismo intervalo de tiempo a los mismos factores de riesgo.

A pesar de que el cáncer de mama, ha sido considerado un tipo de enfermedad neoplásica, la biología celular y molecular del mismo indicarían la existencia de heterogeneidad en cuanto a subtipos tumorales a la cual se puede arribar por causa de múltiples factores tales como alteraciones a niveles epigenéticos, genéticos y transcripcionales.

Progresión y clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama no es una única enfermedad en cuanto a su presentación. En cambio, es una colección de enfermedades de la mama que tienen diversas histopatologías, variaciones genéticas / genómicas y respuestas clínicas. Existen varios tipos de lesiones benignas en la mama humana, y sólo unas pocas parecen tener un potencial premaligno significativo. Las lesiones premalignas mejor caracterizadas son: hiperplasia ductal atípica (HDA), hiperplasia lobular atípica (HLA), carcinoma ductal in situ (CDIS), y carcinoma lobular in situ (CLIS). La HDA puede progresar para convertirse en CDIS preinvasivo, seguido por una posible progresión a carcinoma ductal invasivo (CDI) y la culminación con la enfermedad metastásica.

El CDIS es una lesión neoplásica local sin compromiso del tejido regional adyacente y precursora de los CDI. Estudios epidemiológicos establecieron que las pacientes con CDIS poseen un riesgo 10 veces mayor de desarrollar CDI que las mujeres sin antecedentes de este tipo de lesión. Se estima que un tercio de dichas lesiones premalignas, si no son tratadas, progresarían a CDI (Kerlikowske, 2010).

Se desconoce la razón por la cual solo algunos CDIS progresan al estadio invasivo, mientras que otros aparentemente no lo hacen. Por ello, la detección del subgrupo de CDIS con potencial de progresión no solo reduciría dramáticamente la incidencia de CDI facilitando

el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, sino también impactaría positivamente disminuyendo el sobretratamiento de pacientes (Bleyer, 2012).

El análisis de perfiles de expresión génica ha sido extensamente aplicado al estudio de la progresión del cáncer de mama humano, permitiendo la identificación de nuevos subtipos tumorales. En un estudio pionero, Perou y col. (2000) demostraron que los carcinomas primarios infiltrantes de mama podían ser clasificados en 5 subtipos tumorales intrínsecos, en función de los patrones de expresión génica a escala genómica (Perou y otros, 2000). Estos grupos fueron denominados como: carcinomas del tipo Luminal A y Luminal B, ambos receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP) positivos; carcinomas del tipo basal/triple negativos (RE negativo, RP negativo, HER2 negativo); carcinomas HER2/NEU positivos y RE negativos; y carcinomas con perfiles de expresión similares a los de las células epiteliales normales. Es importante mencionar que cada uno de los subtipos tumorales intrínsecos posee valor pronóstico / predictivo, donde los subtipos luminales presentan la mejor curva de supervivencia en contraste con los subtipos basales con el peor valor pronóstico.

Estudios genómicos y sus aplicaciones

El nacimiento del Proyecto del Genoma humano dio lugar a la genómica estructural que tiene como principal objetivo determinar, mapear y anotar las secuencias nucleotídicas codificantes y no codificantes de los genomas completos en los distintos organismos (Quackenbush, 2011). El resultado de cualquier proyecto 'genoma', es la descripción digitalizada y estandarizada de la estructura del mismo, pero dista mucho de comprender su comportamiento. Cabe hacer la analogía con los cientos de años que costó pasar de una descripción detallada de la anatomía humana, a comprender la función de los

distintos órganos y tejidos. El conocimiento de la secuencia completa del genoma y de la localización de todos los genes, no es más que una descripción ‘anatómica’ del genoma.

Por otro lado, la genómica funcional se encarga de la recolección sistemática de información sobre la función e interacción entre genes y/o proteínas, mediante la aplicación de aproximaciones experimentales globales. Es una de las ciencias que permite comprender cómo funciona el genoma en su conjunto, mediante la expresión controlada de todos y cada uno de sus genes.

Existen distintas disciplinas dentro de la genómica funcional, en general nombradas con el sufijo “ómica”. La principal diferencia entre las omicas es la especie de macromolécula objeto de estudio. De esta manera, la transcriptómica se encarga de la caracterización de transcriptomas, es decir el estudio de la expresión de todos los genes de un genoma en una muestra determinada. La proteómica persigue la caracterización de la totalidad de las proteínas expresadas en un grupo celular o tejido en particular.

De esta manera, la finalización del Proyecto Genoma Humano ha dado lugar al desarrollo de numerosas metodologías de análisis en genómica funcional, produciendo un gran impacto en el estudio de las bases genéticas de enfermedades complejas tales como el cáncer (Quackenbush, 2011). En general estas metodologías se basan en el análisis de datos genómicos, generados mediante el uso de diferentes tecnologías (Figura 2). Entre las tecnologías más populares se encuentran las plataformas basadas en la hibridación reversa sobre matrices sólidas (micro-arreglos de ADNc u oligonucleótidos) y las plataformas basadas en la re-secuenciación de genomas y transcriptomas (Exome-Seq, RNA-seq, etc.). Dichas tecnologías pueden emplearse para caracterizar cambios a nivel epigenético (como las modificaciones en histonas y los fenómenos de hipo/hipermetilación de regiones CpG), genómicas (mutaciones, variaciones en el número de copia de los genes, alteraciones numéricas y estructurales) y transcriptómicas (en genes codificantes y no codificantes).

En el ámbito de la genómica funcional, se destacan los análisis de perfiles de expresión génica; éstos tienen como objetivo principal la identificación de un grupo de genes, cuyo patrón de expresión se encuentren asociados a un fenotipo en particular, concepto conocido como 'gene expression signature' o 'signature'. Un objetivo particular de los 'signatures' en el ámbito de la medicina, es su utilidad como biomarcador diagnóstico, pronóstico o predictivo de una patología en estudio. Los biomarcadores con valor pronóstico permiten estimar la evolución de la enfermedad permitiendo mejor la estratificación de pacientes según su pronóstico de progresión. Por otro lado, biomarcadores con valor predictivo permiten predecir si un tratamiento tendrá o no efecto en un paciente, logrando evitar tratamientos en pacientes para los cuales se supone no tendrán la respuesta esperada.

Objetivos

Debido a que es esencial ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la progresión de lesiones pre-malignas a malignas, el cual es actualmente limitado. El objetivo principal del presente trabajo fue el de identificar subgrupos de carcinomas ductales *in situ* con riesgos de progresión diferencial al estadio invasivo de la enfermedad mediante una aproximación en genómica funcional.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 30 CDIS de alto grado y sus respectivas muestras mamarias normales adyacentes al tumor. Estas muestras fueron obtenidas del Biobanco de tumores del MDACC. Además se analizaron 10 muestras de tejido mamario normal obtenidas de mamoplastias cosméticas del Cooperative Human Tissue Network para su poste-

rior uso en la identificación de genes diferencialmente expresados y metilados respecto a los CDIS. El ADN y ARN se extrajo mediante el empleo de TRIZOL (Life Technologies) y el kit Rneasy y Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germantown, MD). Las concentración e integridad del ADN y ARN se determinó con el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies; Santa Clara, CA). Las muestras de ARN con valores de integridad (RIN) superiores a 8.0 fueron consideradas para su subsecuente secuenciación mediante el protocolo de Illumina TruSeq RNA Sample Prep Kit. La secuenciación se realizó mediante la plataforma Illumina HiSeq2000. El control de calidad de los archivos FASTQ se realizó mediante el empleo del programa FASTQC. Se utilizó software TRIMMOMATIC cuando se requirió la edición de las mismas (ejemplo: remoción de los adaptadores, etc.). Posteriormente, las lecturas fueron alineadas contra el genoma de referencia UCSC Hg19 mediante el paquete de R/Bioconductor Rsubread. Luego se emplearon los paquetes GenomicFeatures y GenomicAlignments para el conteo de cada mapeo en el transcriptoma de referencia (TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene). El análisis estadístico de los perfiles de expresión génica se realizó mediante el empleo del paquete de R/Bioconductor edgeR para identificar los genes diferencialmente expresados entre grupos ($FC > \pm 2$; $FDR < 0.05$). Las visualizaciones y análisis de enriquecimiento funcional se realizaron con el programa MultiExperiment Viewer software (MeV v4.9) y las aplicaciones ClueGo y CluPedia en la plataforma Cytoscape. Los detalles metodológicos se pueden encontrar en la referencia de Abba y col 2015 (Abba y otros, 2015).

Resultados y Discusión

El análisis del exoma, transcriptoma y metiloma de CDIS nos permitió generar el primer catálogo completo de los eventos epigenéticos, genéticos y vías de señalización afectadas en el estadio pre-invasivo del

cáncer de mama. Dicho estudio nos permitió identificar dos grupos de CDIS, uno de alto riesgo de progresión (CDIS-AR) y otro de riesgo moderado de progresión (CDIS-MR) que se diferencian por los subtipos intrínsecos que comprenden, el índice proliferativo, la respuesta inmune y la actividad de determinadas vías de señalización.

Según Cáncer Genome Atlas Network, las mutaciones más prevalentes en genes 'conductores' de la progresión tumoral fueron en *PIK3CA* para los CDIS-MR y en *TP53* para los CDIS-AR de manera similar a lo previamente descrito para carcinomas ductales infiltrantes. Los genes más frecuentemente alterados por mecanismos de amplificación génica fueron en orden decreciente: *ERBB2*, *VEGFA*, *MYC*, *AURKA*, *MDM2*, *FGFR1* y *CCND1*.

A nivel transcriptómico, se identificaron 885 genes diferencialmente expresados entre CDIS-AR y CDIS-MR (FDR < 0.01; log₂FC > 1). El data mining de dichos genes desregulados permitió asociar a los CDIS-AR con vías de señalización altamente proliferativas, infiltrado linfocitario característico de anergia e inmunotolerancia. Mientras que los CDIS-MR expresan las vías de señalización asociadas a la respuesta del estradiol - RE.

Respecto de las alteraciones epigenéticas más relevantes se pudo identificar hipermetilación del gen *HOXA5*, factor de transcripción de *TP53*, en los CDIS-AR. Esta hipermetilación en la región proximal del promotor de *HOXA5* correlacionó con la pérdida de expresión cuando se compararon dichos tumores con el tejido normal de referencia. Otros genes muy relevantes en la biología de las células epiteliales de mama afectados por hipermetilación de sus regiones CpG fueron: *SOX10*, *SOX15* y *SOX17* los cuales fueron previamente caracterizados como genes supresores de tumores por ser antagonistas de la vía de señalización WNT/B-cateninas.

La tecnología actual para el estudio del transcriptoma y proteoma humano ha puesto en evidencia que aproximadamente el 75% del genoma se transcribe, aunque solo el 2% de dichos transcritos codifican proteínas. El 73% restante del transcriptoma corresponde a ARN

no codificantes (ARNnc) que se clasifican en dos grandes grupos: los ARNnc pequeños (snRNA, snoRNA, tRNAs, microRNAs, etc.) y los recientemente descritos ARNlnc. Los ARNlnc son definidos como ARN de más de 200 nucleótidos de longitud sin un marco de lectura abierto (Prensner, 2011). El consorcio GENCODE ha identificado más de 14.000 ARNlnc, los cuales pueden clasificarse según su localización como: ARNlnc génicos (ejemplo: ARNlnc antisentido) o intergénicos (ARNlnc LINC) (Derrien y otros, 2012) (Djebali y otros 2012). Estos exhiben una serie muy variada de funciones, pudiendo operar en cis como amplificadores de la transcripción de genes vecinos, o bien en trans reclutando complejos modificadores de la cromatina. A su vez, pueden actuar como esponjas de microRNAs, como correguladores de receptores nucleares u operar como andamios en procesos involucrados con la maduración y traducción de ARNm (Geisler, 2013). Aunque el conocimiento sobre la biología de los ARNlnc es muy limitado, los ARNlnc están comenzando a ser vinculados con procesos tales como el desarrollo normal (H19, Xist), la organogénesis, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular (Geisler, 2013). Recientemente, dos estudios independientes señalan que los perfiles de expresión de los ARNlnc tendrían el potencial de estratificar a los pacientes con cáncer de mama en subgrupos con valor pronóstico y en asociación al subtipo intrínseco tumoral (Su, 2014) (Shen y otros 2015). Se han podido identificar ARNlnc específicos en el cáncer de mama con características oncogénicas, posibles biomarcadores de progresión tumoral y/o blancos terapéuticos (*HOTAIR*, *LSINCT5*, *SRA1*, *UCA1* y *MALAT1*); así como, ARNlnc que actúan como genes supresores de tumores (*HOTAIRM1*, *ZFAS1*, *PTENP1*, *MEG3* y *GAS5*). Estos estarían involucrados en la proliferación, motilidad, invasión y ciclo celular, así como en la diseminación tumoral metastásica, todos procesos celulares de importancia en el desarrollo neoplásico (Shore, 2014).

Entre los hallazgos más relevante se pudo identificar un grupo de 193 ARNlnc diferencialmente expresados entre muestras normales de mama y CDIS ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$), 127 de los cuales correspondieron a ARNlnc génicos antisentido y 66 a ARNlnc intergénicos (Figura 3). Aproximadamente el 90% de estos ARNlnc (168 de 193) se encontraron sobreexpresados en CDIS. Entre los ARNlnc desregulados en CDIS, cabe mencionar a *HOTAIR* (HOX transcript antisense RNA) y *HOTAIRM1* (HOXA transcript antisense RNA myeloid-specific 1). *HOTAIR* es un promotor de la diseminación metastásica del cáncer de mama, actuando en trans sobre un grupo de genes de la familia *HOXD* y se encontraría sobreexpresado en la mayoría de las neoplasias malignas humanas (Gupta y otros 2010) (Sorensen y otros 2013). Por otro lado, *HOTAIRM1* actúa en cis reprimiendo la expresión de los genes de la familia *HOXA*. Nuestros datos demuestran que *HOTAIR* se encuentra sobreexpresado en CDIS, mientras que *HOTAIRM1* es subexpresado en los estadios pre-invasivos del cáncer de mama. De modo que estos ARNlnc podrían modular conjuntamente la expresión de los genes de la familia *HOX* durante los estadios tempranos del cáncer de mama (Abba, 2015). Los otros ARNlnc identificados como desregulados en CDIS, constituyen un grupo novedoso de transcriptos cuya función celular es desconocida. El análisis de enriquecimiento funcional de los genes co-expresados con dichos ARNlnc permiten inferir funciones asociadas a la regulación del ciclo celular, y las vías de señalización de TP53 y diversas MAPKs mediante interacción con factores de transcripción (Figura 3).

Conclusiones

Del presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1) Existen dos subgrupos de carcinomas ductales in situ que poseen alteraciones epigenómicas, genómicas y transcripcionales diferenciales.

2) Cada subgrupo de carcinomas ductales in situ posee diferentes riesgos de progresión al estadio invasivo.

3) Se identificaron biomarcadores con potencial valor pronóstico.

4) Las vías de señalización diferencialmente activadas entre subgrupos de carcinomas podrían ser utilizadas como nuevas dianas terapéuticas.

Referencias

1. Kerlikowske, K. (2010). Epidemiology of ductal carcinoma in situ. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, (41):139-41.
2. Allred, D.C. (2010). Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 134-8.
3. Bleyer, A., Welch, H.G. (2012). Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *The New England Journal of Medicine*, 367:1998-2005.
4. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B. y otros. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 17; 406(6797):747-52.
5. Quackenbush, J. (2011). *The Human Genome: Book of Essential Knowledge. Imagine!*
6. Abba, M.C., Gong, T., Lu, Y. y otros. (2015) A molecular portrait of high-grade ductal carcinoma in situ (DCIS). *Cancer Res*, 75:3980-90.
7. Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490:61-70.
8. Prensner, J.R., Chinnaiyan, A.M. (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*, 1:391-407.
9. Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G. y otros. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.*, 22:1775-1789.

10. Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A. y otros. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489:101-8.
11. Geisler, S., Coller, J. (2013). RNA in *unexpected places: long noncoding RNA functions in diverse cellular contexts*. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14:699–712.
12. Su, X., Malouf, G.G., Chen, Y. y otros. (2014). Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget*, 5:9864-76.
13. Shen, X., Xie, B., Ma, Z. y otros. (2015 Jun 10). Identification of novel long non-coding RNAs in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*.
14. Shore, A.N., Rosen, J.M. (2014). Regulation of mammary epithelial cell homeostasis by lncRNAs. *Int J Biochem Cell Biol.*, 54:318-30.
15. Gupta, R.A. y otros. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464:1071-6.
16. Sørensen, K.P. y otros. (2013). Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 142:529-36.

Leyendas de las figuras

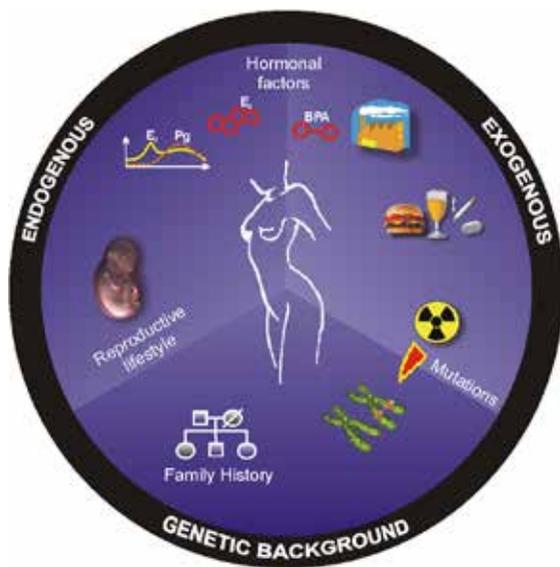


Figura 1. Esquema de los factores exógenos, endógenos y genéticos asociados al desarrollo del cáncer de mama.



Figura 2. Tecnologías genómicas disponibles para la caracterización de epigenomas, genomas y transcriptomas.

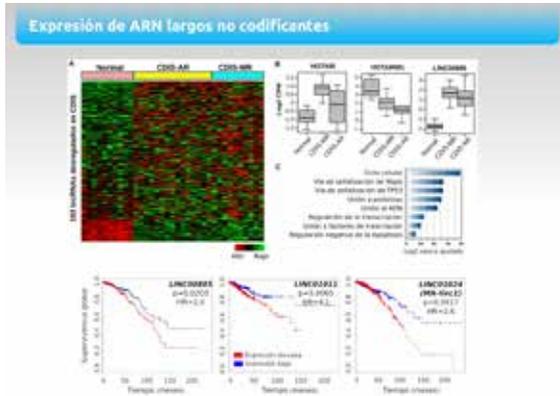


Figura 3. Identificación de ARNlnc desregulados en CDIS. **A.** Mapa de calor de los 193 ARNlnc diferencialmente expresados entre epitelio mamario normal y CDIS (FDR<0.01). **B.** Expresión relativa de los ARNlnc *HOTAIR* ($p=2,63E-9$), *HOTAIRM1* ($p=1,65E-7$) y *LINC00885* ($p=4,09E-16$) en tejidos normales y CDIS. **C.** Análisis de enriquecimiento funcional de los bioprocesos y vías de señalización asociados a los ARNlnc desregulados en CDIS identificados en función a los transcritos codificantes co-expresando en carcinomas mamarios. Análisis de supervivencia de pacientes con carcinomas infiltrantes de mama en función de la expresión de 3 ARNlnc del tipo intergénicos (LINC).

Patologías óseas y envejecimiento

Marcos Plischuk

Resumen: El envejecimiento está asociado a patologías óseas diversas, aunque las más prevalentes son la osteoporosis y la osteoartritis. En este sentido, el objetivo principal de esta investigación es analizar las enfermedades óseas relacionadas con dicho proceso en una población contemporánea. Los individuos analizados forman parte de la Colección Osteológica Lambre (Cátedra de Citología, Histología y Embriología "A", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata). Se observaron 200 esqueletos, de ambos sexos, con edades de muerte comprendidas entre los 22 y 101 años. Se observó una alta frecuencia de individuos con patologías en su sistema esquelético (94%), comprendiendo patologías congénitas, traumas, neoplasias, metabólicas, osteoarticulares, e infecciosas. La osteoporosis fue la enfermedad metabólica más prevalente, mostrando una elevada pérdida de calidad ósea en los rangos etarios más elevados y un inicio más temprano en individuos femeninos. La osteoartritis fue detectada en el 81% de la muestra, sin diferencias entre sexos con un aumento en la cantidad de áreas afectadas en relación a la edad. Esta línea de investigación puede aportar a la salud poblacional, principalmente en el sector de adultos mayores. La comprobación osteo-

lógica de las incidencias clínicas tiene el potencial de convertirse en otra fuente de conocimiento fundado acerca de la dinámica de las osteopatologías y de tal forma también utilizarse dentro de las Ciencias Médicas.

Palabras clave: colección osteológica, paleopatología, osteoporosis, osteoartrosis

Introducción

El análisis de las enfermedades y traumas que afectan al esqueleto humano recibe el nombre de osteopatología, o, de tratarse de individuos que vivieron en un pasado más remoto, se lo denomina paleopatología (Campillo, 2001) (Ortner, 2003). Nuestro proyecto de investigación se planteó desde sus inicios comprender al análisis osteopatológico desde una perspectiva evolutiva a la luz de la Teoría Sintética de la Evolución, entendiendo a las enfermedades como parte de un ajuste fenotípico a las exigencias del ambiente, relegando otras concepciones más generales y tipológicas como las de “*buena salud*” o “*normalidad*” (Plischuk, 2012). Los estudios realizados en patologías óseas provienen en general de la clínica o la experimentación en cultivos celulares, pero advertimos una escasez de análisis osteopatológicas de muestras esqueléticas contemporáneas. Es por esto que desde el año 2007 nos propusimos indagar acerca de las diversas patologías óseas y dentarias que afectan a las personas en la actualidad tomando como material de estudio sus restos esqueléticos.

En función de los resultados hallados en una primera aproximación epidemiológica general (Plischuk, 2012) desarrollamos los lineamientos para una segunda etapa, desarrollándose en la actualidad, caracterizada por la búsqueda de patrones en patologías óseas relacionadas con el envejecimiento. El deterioro fisiológico progresivo conlleva a un aumento de la morbi-mortalidad y una disminución

de la fertilidad con la edad (Kirkwood, 1977) (Gavrilov, 2002). El envejecimiento es entonces una etapa que abre múltiples interrogantes a la Teoría Sintética de la Evolución, ya que disminuye el potencial reproductivo y la supervivencia de los organismos, ambas partes del *fitness* adaptativo (Defays, 2011). Considerando que el envejecimiento es una etapa ontogenética que también puede evolucionar, hecho observable al comparar las historias de vida de diversos primates por ejemplo (Martínez Gómez, 2002), se han propuesto varias explicaciones para dar cuenta de la aparición del envejecimiento en la especie humana. Una de ellas se conoce como teoría de pleiotropía antagonista y postula la segregación de genes pleiotrópicos con alelos beneficiosos en la juventud, pero perjudiciales en edades post-reproductivas (Williams, 1957). El envejecimiento habría evolucionado como subproducto de la selección natural (Nelson y Weiss, 1999), originando un fenómeno de compromiso evolutivo o “*trade off*” (Baudisch, 2009) entre el aumento de la esperanza de vida observado en la especie humana (Bernis, 2004); (Blomquist, 2009) y el incremento en las prevalencias de osteopatologías degenerativas (13). Es en este sentido que entendemos a la osteoporosis y la osteoartritis (OA) como la manifestación de sucesivos cambios adaptativos a lo largo de nuestro camino evolutivo (Nelson y Weiss, 1999), y nos propusimos su análisis epidemiológico en una población local y contemporánea.

Objetivos

Objetivo general

Analizar las patologías óseas de una población contemporánea a partir de una aproximación epidemiológica a una muestra esquelética documentada.

Objetivos específicos (1° Etapa)

1) Analizar la variabilidad de patologías existentes en la muestra estudiada, estableciendo la etiología de las mismas.

2) Analizar las patologías observadas en relación con los datos documentales relevados.

3) Discutir el perfil paleopatológico de la población de referencia en función de su contexto socio-histórico

Objetivos específicos (2° Etapa)

1) Evaluar la pérdida de Densidad Mineral Ósea (DMO) en relación al envejecimiento.

2) Identificar los diferentes grados de pérdida de DMO en diversos elementos óseos (fémur, vértebras, calcáneo)

3) Analizar la expresión dimórfica de la pérdida de DMO.

4) Identificar modificaciones esqueléticas provocadas por OA.

5) Analizar la expresión dimórfica y etaria de la pérdida de DMO.

Hipótesis

En relación a los objetivos mencionados se propusieron para la primera etapa dos hipótesis principales:

1) Visto el perfil etario de la muestra analizada y la expectativa de vida promedio de la población en cuestión, se estima hallar una alta prevalencia de patologías osteoarticulares y de condiciones relacionadas a la pérdida de DMO.

2) Dado el contexto sociohistórico de la población generadora de la muestra esquelética, se observará una baja prevalencia de lesiones atribuibles a enfermedades infecciosas.

Para la segunda etapa las hipótesis planteadas fueron las siguientes

3) Existe una correlación positiva entre la pérdida de DMO y el envejecimiento observable en restos esqueléticos.

4) La pérdida de DMO en individuos de sexo femenino es observable a edades más tempranas.

5) Existe una correlación positiva entre la intensidad de la OA y el envejecimiento observable en restos esqueléticos.

6) Existe una correlación positiva entre la cantidad de áreas afectadas por OA y el envejecimiento observable en restos esqueléticos.

Materiales y Métodos

Los individuos analizados forman parte de la Colección Osteológica Profesor Doctor Rómulo Lambre, alojada en la Cátedra de Citología, Histología y Embriología "A", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (FCM-UNLP) (Fig. 1). Dichos restos fueron donados periódicamente por el Cementerio Municipal La Plata (CMLP) a la FCM con el fin de ser utilizados en docencia e investigación (Ordenanza Municipal 9471/02). Los mismos pertenecen a cadáveres destinados a osario común o cremación que, de acuerdo a las normas del Cementerio (Ordenanza Municipal 7638/90), pertenecen a individuos no reclamados y exhumados por el personal que allí se desempeña (Salceda y otros, 2012). A partir del análisis de este material se han desarrollado proyectos de investigación acreditados por instituciones del sistema científico nacional cuyos resultados parciales han sido volcados en artículos en las revistas periódicas referenciadas en este capítulo como así también en encuentros académicos de la especialidad y en Tesis Doctorales de Plischuk (2012), Desántolo, (2013) y García Mancuso, (2012). Además de las de Garizoain y Petrone en curso. Todos los trabajos realizados con la Colección Osteológica Lambre se enmarcan en la legislación municipal vigente, y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad

de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (COBI-MED Res. 800-13312/12).

Durante la 1° etapa de investigación se observaron 100 esqueletos, los cuales de acuerdo a las Actas del CMLP pertenecían en 67 casos al sexo masculino y 33 al femenino. Las edades de muerte abarcaron desde los 22 a los 101 años (promedio general: 68,59 años, masculinos: 66,22 años y femeninos: 73,39), y las fechas de fallecimiento comprendieron el lapso 1936-2001). Para los análisis de imágenes radiológicas fueron seleccionados 30 individuos, 15 de cada sexo, y para los estudios de cavidad oral se seleccionaron 35 cráneos que presentaran una adecuada preservación.

Para la 2° etapa fueron seleccionados otros 100 esqueletos de individuos adultos de la misma colección, con el criterio de disminuir el promedio de edad muestral y observar el comportamiento de las osteoporosis y la OA en edades tempranas. El promedio de edad en este caso fue de 59,83 años para la muestra total, siendo 60,74 para el sexo femenino (n=50) y 58,92 para el masculino (n=50), mientras que las fechas de fallecimiento abarcaron el período 1927-2012.

Para realizar el análisis osteopatológico general de la 1° etapa se estableció el grado de preservación y conservación del material y posteriormente se evaluaron las anomalías esqueléticas presentes. Para esto último se procedió al análisis morfológico describiendo cada lesión ósea observando el material macroscópicamente a ojo desnudo y con lupa 10x en los casos en que fue necesario (Campillo, 2001) (Buikstra, 1994).

Considerando el tipo de respuesta del organismo (variación en el número de huesos, osteolisis, osteogenia anómala, variaciones de volumen, fracturas, entre otras) (1), se realizó un paleodiagnóstico con el objetivo de adscribir las lesiones a ciertas categorías de procesos patológicos, comprendiendo siempre a los mismos en interacción y sinergia con otros factores y patologías, más allá del sistema arbitrario de clasificación elegido (Ortner, 2003).

Las patologías fueron clasificadas en 4 grandes grupos, debido a su origen, tejido afectado y distribución esquelética:

I- Patologías congénitas: Las que se originan a causa de anomalías génicas o problemas durante el desarrollo intrauterino (espondilosis congénita, occipitalización del atlas, sacralización, desviaciones de la columna vertebral, defectos en mano y pie, defectos por disfunciones endócrinas, anomalías volumétricas y craneostenosis, huesos supernumerarios) (Aufderheide, 1989).

II- Patologías adquiridas: Lesiones óseas que el individuo adquirió durante su vida postnatal.

Osteoarticulares (espondiloartropatías, hernias discales, artritis reumatoidea, OA).

Traumas (fracturas, dislocaciones, periostitis).

Infecciosas (osteomielitis, periostitis, tuberculosis, treponematosis).

Neoplasias.

Metabólicas (anemias, raquitismo y osteomalacia, enfermedad de Paget, osteoporosis). En el caso de la osteoporosis, durante la 1° etapa se evaluaron las fracturas osteoporóticas y se realizó un análisis exploratorio radiológico en 30 individuos a partir de fémur proximal. Estos últimos fueron realizados mediante un equipo Polimatch Siemens 120 kV 500 mAs. del Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos San Juan de Dios (La Plata).

III- Cavidad Oral: Lesiones que afectaban los tejidos dentarios y/o el hueso alveolar (periodontitis, caries, abscesos, cálculos o sarro, hipoplasia del esmalte, reabsorción de la arcada alveolar) (Hillson, 2005).

IV- Intervenciones terapéuticas: Modificaciones generadas por la acción clínica que brindaron información acerca de las patologías

del individuo (prótesis femorales, aceros quirúrgicos, amputaciones, prótesis y restauraciones dentales).

Durante la 2° etapa están realizando estudios tendientes a tener una visión más precisa de dos patologías relacionadas con el envejecimiento, la osteoporosis y la OA. Para la evaluación de la DMO en el diagnóstico de osteoporosis se continuó con el análisis de fracturas osteoporóticas (fémur, vértebra y radio), al cual se sumó un estudio sistemático radiológico a partir de fémur y calcáneo. Ambos huesos fueron analizados mediante técnicas morfológicas y morfométricas de pérdida de calidad ósea (Singh, 1970) (Pande y otros, 2005) (Curate y otros 2009). En esta etapa las radiografías fueron obtenidas en un equipo digital de alta definición Pimax 500 del Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. Rodolfo Rossi de la ciudad de La Plata.

Resultados

Los resultados alcanzados mostraron una alta frecuencia de individuos con patologías en su sistema esquelético alcanzando un 94%. Cuando se observan los individuos con patologías agrupados de acuerdo a su edad se nota un incremento notorio de la prevalencia de la mayoría de las patologías.

Sólo fueron hallados cinco individuos con patologías congénitas, todos ellos con edades similares o menores al promedio de edad de muerte de la muestra. Las patologías halladas fueron espina bífida, coalición tarsal, huesos supernumerarios y occipitalización del atlas.

Dentro de las patologías adquiridas fueron hallados 91 individuos con lesiones osteoarticulares, siendo la OA la que presentó una mayor prevalencia (81%) sin diferencias entre sexos ($z=0,26$ $\alpha=0,05$) (Plischuk, 2011) a la vez que se registró un aumento en la cantidad de áreas afectadas en relación a la edad de los individuos ($r=0,494$). Las áreas articulares más afectadas fueron la acromio-clavicular, la columna vertebral y la articulación coxofemoral (Fig. 3). Otras pa-

tologías articulares halladas fueron las hernias discales (en forma de Nódulos de Schmörl) (27%) (Plischuk, 2018), hiperostosis esquelética difusa idiopática (DISH) (6%) (19) (Fig. 4) y espondilitis anquilosante (6%) (Plischuk, 2015).

El 36% de los esqueletos presentó señales compatibles con traumas, sin diferencias entre los sexos ($z=0,11$; $\alpha=0,05$). Los elementos con mayor prevalencia de lesiones fueron las vértebras y el fémur, presentando fracturas con rasgos atribuibles a traumas por patología de base como fracturas osteoporóticas.

Solo fueron hallados un caso de infección ósea, probablemente asociada a una intervención quirúrgica de implante en la cabeza femoral, y una neoplasia, en forma de osteoma sésil en el hueso frontal.

La osteoporosis en tanto fue la enfermedad metabólica más prevalente, evidenciada en las fracturas osteoporóticas ya mencionadas y en los análisis radiológicos de las dos etapas de nuestro proyecto (18). Estos últimos estudios mostraron una elevada pérdida de calidad ósea en los rangos etarios más elevados de la muestra (Figs. 5 y 6), así como un inicio más temprano en el caso de los individuos de sexo femenino.

Las patologías de la cavidad oral fueron en su mayoría de tipo periodontal (75%), aunque también fueron relevados casos de caries, abscesos, sarro e hipoplasia del esmalte. Fue notoria la alta frecuencia de individuos con reabsorción total de la arcada dentaria.

Por último, se detectaron 23 señales de intervenciones clínicas, correspondiendo principalmente a artroplastias de cadera (Fig. 7), restauraciones odontológicas y aceros quirúrgicos postoperatorios (Plischuk, 2010-2012).

Conclusiones

En función de los resultados alcanzados en la 1° etapa del proyecto podemos aceptar nuestras dos hipótesis principales de trabajo. Por

un lado, observamos que las enfermedades con una mayor prevalencia en la muestra fueron aquellas relacionadas con el envejecimiento (osteoporosis y OA). Fisiológicamente, esta etapa ontogenética se encuentra ligada a una degeneración celular progresiva (por radicales libres y glicación de proteínas) y una pérdida en la capacidad adaptativa del organismo. Estos factores, sumados a las mejoras en las condiciones de vida y adelantos técnicos que incrementan la expectativa de vida, hacen del envejecimiento un proceso complejo y de vital relevancia para los estudios osteológicos.

En este sentido, la escasa representación de patologías infecciosas también podría relacionarse con las medidas de higiene y salubridad, el descubrimiento y desarrollo de antibióticos. Sin embargo, pese a no presentar un correlato evidente en el sistema esquelético, es conocida la reemergencia de enfermedades infecciosas, potenciada por la interacción de factores sociales, cambios demográficos y ambientales (Armélago, 2005).

Esta línea de investigación, caracterizada por una perspectiva epidemiológica de las osteopatologías, puede aportar a la resolución de problemas de salud poblacional, principalmente en el sector de adultos mayores. La comprobación osteológica de las incidencias calculadas en función de encuestas, exámenes clínicos, radiológicos, densitométricos, entre otros, tiene el potencial de convertirse en otra fuente de conocimiento fundado acerca de la dinámica de las osteopatologías y de tal forma también utilizarse dentro de las Ciencias Médicas.

En este marco es que las tareas diseñadas a futuro por nuestro grupo de investigación tiendan a precisar el conocimiento generado en base a otras técnicas de aproximación, como la densitometría, microscopía, análisis experimentales de resistencia ósea, así como también la comparación de los resultados obtenidos con colecciones de similares características.

Para finalizar, sostenemos que estudios como los reseñados aquí demuestran una vez más la importancia del medio ambiente originando pérdidas de ajuste adaptativo, los cuales deberán ser mediados

culturalmente con el objeto de contribuir a la salud poblacional. Ésta última solo logrará ser un fin en sí misma sólo si se acompaña con las facultades del individuo sano y de su contribución productiva al progreso social.

Bibliografía

- 1 Campillo, D. (2001). *“Introducción a la Paleopatología”*. Barcelona: Edicions Bellaterra S.L.
- 2 Ortner, D. (2003). *“Identification of pathological conditions in human skeletal remains”*. Nueva York: Academic Press.
- 3 Plischuk, M. (2012). *Detección y diagnóstico de patologías en restos óseos humanos. Aproximación epidemiológica a una muestra documentada*. Tesis Doctoral. Naturalis. Repositorio Institucional de la FCNyM, UNLP. Argentina. http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/repositorio/_documentos/tesis/tesis_1189.pdf Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- 4 Kirkwood, T. (1977). “Evolution of ageing”. *Nature*, 270, 301–304.
- 5 Gavrilov, L. y Gavrilova, N. (2002). “Evolutionary theories of aging and longevity”. *The Science World Journal*, 2, 339-356.
- 6 Defays, R. (2011). *“Base genética de la respuesta a diferentes agentes de estrés ambiental y de la longevidad en el organismo modelo Drosophila”*. Tesis Doctoral. FCEN, UBA. www.digital.bl.fcen.uba.ar
- 7 Martínez Gomez, J. (2002). “Historias de Vida”. En Gómez de Silva, H. y Oliveras de Ita A. (eds). *Conservación de aves. Experiencias en México* (pp. 335-361). México D.F.: Museo de Historia Natural.
- 8 Williams, G. (1957). “Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence”. *Evolution*, 11, 398–411.
- 9 Nelson, D. y Weiss, M. (1999). “Aging through the ages”. En Rosen, C., Glowacki, J. y Bilezikian, J. (comps.). *The aging skeleton* (pp. 3-9). San Diego: Academic.

- 10 Baudisch, A. (2009). "How ageing is shaped by trade-offs". Rostock: MPIDR Working Papers
- 11 Bernis, C. (2004). "Envejecimiento, poblaciones envejecidas y personas ancianas". *Antropo*, 6, 1-14.
- 12 Blomquist, G. (2009). "Trade-off between age of first reproduction and survival in a female primate". *Biology Letters*, 5, 339-342.
- 13 Curate, F. (2014). "Osteoporosis and paleopathology: a review". *Journal of Anthropological Science*, 92, 119-146.
- 14 Plischuk, M. (2010). "Señales de intervenciones médicas en una muestra esquelética contemporánea (La Plata, Argentina)". *Revista de la Escuela de Medicina Legal*, 15, 4-13.
- 15 Plischuk, M. y Salceda, S. (2011). "Evidencia esquelética de osteoartritis en una muestra contemporánea". *Revista Española de Antropología Física*, 32, 43-49.
- 16 Plischuk, M. y Salceda, S. (2015). "Espondilitis Anquilosante en una población contemporánea de La Plata, Argentina". *Revista Española de Antropología Física*, 36, 22-32.
- 17 Salceda, S., Desántolo, B., García Mancuso, R. y otros. (2012). "The 'Prof. Dr. Rómulo Lambre' Collection: an Argentinian sample of modern skeletons". *HOMO*, 63, 275-281.
- 18 Plischuk, M., Inda, A. y Errecalde, A. (2014). "Modificaciones de la estructura ósea del fémur proximal. Análisis de una muestra esquelética". *Revista Argentina de Radiología*, 78, 42-48.
- 19 Plischuk, M. e Inda, A. (2015). "Hiperostosis Esquelética Difusa Idiopática en una colección osteológica contemporánea (La Plata, Buenos Aires, Argentina)". *Revista del Museo de Antropología*, 8(1), 147-156.
- 20 Plischuk, M., Desántolo, B. y García Mancuso, R. (2018). "Nódulos de Schmörl en una serie esquelética contemporánea de La Plata, Argentina". *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 20(1), 1-9.
- 21 Desántolo, B. (2013). "Validación metodológica para la estimación de edad en restos óseos humanos adultos: Análisis histomorfométrico". Tesis doctoral. SeDiCI. Repositorio Institucional de la UNLP.

- <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27879> Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.
- 22 García Mancuso, R. (2013). “*Análisis bioantropológico de restos esqueléticos de individuos subadultos. Diagnóstico de edad y sexo, validación técnico-metodológica*”. Tesis Doctoral. Naturalis. Repositorio Institucional de la FCNyM, UNLP. Argentina. http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/repositorio/_documentos/tesis/tesis_1257.pdf Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- 23 Buikstra, J. y Ubelaker, D. (1994). “*Standards for data collection from human skeletal remains*”. Fayetteville: Arkansas Archaeological Survey Research Series N° 44.
- 24 Aufderheide, A. y Rodríguez Martín, C. (1998). “*The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology*”. Cambridge: Cambridge University Press.
- 25 Waldron, T. (2009). “*Palaeopathology*”. Nueva York: Cambridge University Press.
- 26 Hillson, S. (2005). “*Teeth*”. Cambridge: Cambridge University Press.
- 27 Singh, M., Nagrath, A. y Maini, P. (1970). “Changes in trabecular pattern of the upper end of the femur as an index of osteoporosis”. *Journal of Bone Joint Surgery*, 52-A, 457-467.
- 28 Pande, K., Pande, S., de Takats, D. y otros. (2005). “Modified calcaneal index: a new screening tool for osteoporosis based on plain radiographs of the calcaneum”. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 13(1), 27-33
- 29 Curate, F., Piombino-Mascoli, D., Tavares, A. y otros. (2009). “Asso-tigliamento corticale del femore e fratture da fragilità ossea: uno studio della Collezione Scheletrica Identificata di Coimbra (Portogallo)”. *Archivio per l'Antropologia e la Etnologia*, 139, 129-146.
- 30 Armelagos, G., Brown, P. y Turner, B. (2005). “Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease”. *Journal of Social Science and Medicine*, 61, 755-765.

Leyendas de las figuras



Figura 1. Colección Osteológica R. Lambre.



Figura 2. Coalición calcáneo-escafoidea.



Figura 3. Osteoartritis en vértebras cervicales.



Figura 4. Hiperostosis Difusa Idiopática Esquelética (DISH).



Figura 5. Radiografía de fémur izquierdo, epífisis proximal. Distribución trabecular normal.



Figura 6. Radiografía de fémur izquierdo, epífisis proximal. Distribución trabecular de un individuo con osteoporosis.



Figura 7. Artroplastia total de cadera. Se observan prótesis de acetábulo y de cabeza femoral.

Kinesia paradójal, estigma y Enfermedad de Parkinson

*María de los Angeles Bacigalupe
Silvana Pujol*

Introducción y objetivo

El Taller de Parkinson (TdP) constituye un Programa estable de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) desde el año 2013, aunque su comienzo se remonta al año 2002 cuando el Jefe de Servicio de Neurología de ese momento del Hospital Dr. A Korn, Neurólogo José Luis Dillon, reunió a un grupo de profesionales entre los cuales se encontraban las autoras de este artículo para desarrollar el TdP.

La iniciativa surgió a partir de la experiencia clínica de su creador y el objetivo fue mejorar la calidad de vida de las personas con Enfermedad de Parkinson (EP) a partir de la generación de espacios que utilizaran lenguajes lúdicos y artísticos para promover la motricidad paradójal. La idea central radicaba en que el paciente con EP tuviera la oportunidad de ponerse a prueba a sí mismo y comprobar que las potencialidades motoras estaban conservadas a pesar de creerse perdidas a raíz de la enfermedad. En el año 2006 el TdP empezó a trabajar junto a la UNLP en el área de extensión.

Cabe aclarar que la EP es conocida como un trastorno neurodegenerativo del movimiento cuya prevalencia se encuentra en segundo lugar dentro de las enfermedades neurodegenerativas y cuyo diagnóstico es clínico, aunque se está trabajando en la búsqueda de biomarcadores y otros indicadores prodrómicos y tempranos (Peña-Nogales y otros, 2019).

Si bien es un programa de extensión universitaria, el TdP presenta un panorama oportuno para la investigación científica y a partir de allí es que constituye el escenario del estudio de la kinesia paradójal como modo de relación individuo-entorno.

Entendemos por kinesia paradójal al fenómeno comportamental donde las personas con EP pueden moverse de modo inesperado, como si no tuvieran EP. Este fenómeno es relacional en tanto depende de las posibilidades del individuo con Parkinson (las personas con EP conservan su movimiento; la modulación de éste es lo que se altera) y de las *affordances* del entorno, es decir, las cualidades contextuales que constituyen una oportunidad de comportarse. Por ejemplo, una pelota en movimiento constituye una *affordance* que invita al individuo a capturarla. Las personas con EP ponen en juego las propiedades de su sistema perceptivo-motor para responder a su ambiente estimulante y de ese modo, *paradojalmente*, pueden moverse. La kinesia paradójal ha sido reconocida por diversos investigadores a partir de su descripción como tal por el neurólogo francés Alexander Souqués (Souques, 1921) (Bicigalupe, 2014). El TdP usa las propiedades comportamentales de la kinesia paradójal para mejorar el movimiento de las personas con EP, asumiendo que el movimiento constituye un factor relevante en el mejoramiento de su calidad de vida y sus relaciones con su entorno. Se ha visto que para las personas con EP la dificultad para caminar tiene un impacto complejo y multifacético -incluyendo aspectos físicos y emocionales- así como también impacta en la capacidad para ser activo y participar en situaciones de la vida diaria (Hammarlund y otros, 2014). Las personas que asisten

al TdP han pasado por un periodo de aprendizaje del movimiento a través de esta propiedad de la kinesia paradójal.

Como enfermedad crónica que amenaza la funcionalidad de la persona, tener EP puede conducir a ser estigmatizado y/o autoestigmatizarse, con la consecuente disminución del bienestar del enfermo y de su entorno cercano.

Se llama estigma a una experiencia individual compleja en la que interactúan las manifestaciones de una enfermedad con los medioambientes sociales, afectando la identidad personal y el sentido del yo. El grado en que una condición puede ser considerada estigmatizante depende de distintos factores. La persona con la condición en cuestión generalmente es etiquetada con un sentido social negativo que con la repetición conduce a un proceso de internalización con consecuencias negativas, como baja autoestima y bienestar, disminución en el soporte social, alteración de la dinámica familiar y mayor vulnerabilidad a la enfermedad. El estigma no es sólo un proceso interno sino un proceso que involucra las respuestas negativas de las personas del medioambiente (Burgener, 2008).

El estigma implica que la persona estigmatizada es desacreditada, se la considera mala, peligrosa o débil, diferente a lo que se estima normal y aceptado y, como consecuencia, el individuo es aislado y su identidad social queda amenazada; asimismo, el estigma presenta un efecto negativo importante en la progresión y el manejo de la enfermedad en personas con Parkinson (Maffoni y otros, 2017).

Considerando que la calidad de vida de las personas con Parkinson se ve afectada por sus capacidades de movimiento y que a la vez estas personas sufren un estigma social, podríamos suponer que el mejoramiento de la movilidad a través del uso terapéutico de la kinesia paradójal podría tener alguna relación con su calidad de vida y con su percepción del estigma.

En los siguientes apartados desarrollamos brevemente una investigación realizada sobre la percepción del estigma en las personas con EP que participan o han participado del TdP. Aunque los datos que

mostramos no constituyen un estudio experimental sino descriptivo y que se limita a sólo uno de los aspectos de nuestro supuesto (cfr. párrafo anterior), los resultados nos permiten desarrollar una hipótesis de trabajo vinculada con la kinesia paradójal para explorar en futuros estudios.

Materiales y métodos

En el contexto del enfoque metodológico de investigación de métodos mixtos (Creswell, 2009) desarrollamos un estudio descriptivo de corte cuantitativo sobre la percepción del estigma en personas con EP.

Participantes

Trabajamos con 17 personas con EP que asisten o han asistido al TdP (edad en años= $70[\pm 7]$, severidad según escala Hoehn-Yahr $2,4[\pm 1,1]$, evolución en años= $9,9[\pm 6,9]$, levodopa diaria en mg= $647,7[\pm 453]$, nivel educativo desde universitario a primario distribuido cuasi-uniformemente). Los participantes no presentaron otras condiciones de salud que pudieran afectar su autocrítica.

Materiales

Escala de estigma de Fife y Wright (2000) traducida *ad hoc* al castellano, escala validada por Burgener y Berger (2008), autoadministrable, que adquiere la forma de una escala Likert (1= completamente de acuerdo, 4= completamente en desacuerdo y 0= no aplica). La versión original se compone de 24 ítems agrupados en dos dimensiones que a su vez se subdividen en cuatro subdimensiones: experiencia de rechazo y estigma (rechazo social e inseguridad financiera) y sentimiento sociopsicológico relacionado con el estigma (vergüenza internalizada y aislamiento social).

Análisis de datos

Análisis descriptivo con obtención de correlaciones entre variables (significatividad $p \leq .05$) con la asistencia de los programas Microsoft Excel y SPSS 15.

Nota ética

Fueron seguidos los principios enunciados en la Declaración de Helsinki y sus enmiendas según World Medical Association.

Resultados y discusión

Las medianas obtenidas (con mínimo y máximo) de las 4 sub-dimensiones de la escala de estigma fueron las siguientes: rechazo social 1, inseguridad financiera 2, vergüenza internalizada 2 y aislamiento social 2,5 (Peña-Nogales, 2019) (Bicigalupe, 2014).

Para poder comparar con la bibliografía se obtuvieron también las medias y desvíos de las 4 sub-dimensiones, a saber: rechazo social 1,44($\pm 0,66$), inseguridad financiera 1,74($\pm 0,77$), vergüenza internalizada 1,76($\pm 0,71$) y aislamiento social 2,38($\pm 0,91$).

Analizando las posibles correlaciones significativas entre variables demográficas (edad, escolaridad, tiempo desde el diagnóstico, Hoehn-Yahr y dosis diaria de levodopa) y las sub-dimensiones de la escala de estigma, hallamos lo siguiente.

La edad de los participantes se correlacionó significativamente con rechazo social (Gamma= $-.577$, $p=.006$) y con inseguridad financiera (Gamma= $-.495$, $p=.006$). Ambas asociaciones fueron inversas o negativas.

El tiempo de evolución de la enfermedad se asoció con vergüenza internalizada (Gamma= $.495$, $p=.013$) y con aislamiento social (Gamma= $.683$, $p=.000$). Ambas asociaciones fueron no inversas o positivas.

La severidad de la enfermedad según la escala Hoehny Yahr y la dosis diaria de Levodopa se asociaron con aislamiento social ($\Gamma = .474$, $p = .011$ y $\Gamma = .634$, $p = .000$, respectivamente). Las asociaciones fueron positivas.

De acuerdo a estos resultados, en este grupo de participantes con EP observamos que a mayor edad se percibió menor rechazo social e inseguridad financiera como producto de tener EP. Asimismo, observamos que el mayor tiempo de evolución desde el diagnóstico se correlacionó con mayor percepción de vergüenza internalizada y aislamiento social. Finalmente, mayor severidad de la enfermedad y mayor dosis de medicación para EP se asociaron a mayor experiencia de aislamiento social.

Al comparar nuestros resultados con Burgenery Berger observamos que las medias de las sub-dimensiones son muy distintas a las obtenidas en el estudio citado. Aquellos autores trabajaron con personas agrupadas en dos grupos, uno con EP y otro con Enfermedad de Alzheimer, validando la escala y analizando las diferencias entre los grupos. En cuanto a los resultados de las personas con Parkinson, los autores obtuvieron medias por encima de las halladas en nuestro grupo, sobre todo para rechazo social, aislamiento social y vergüenza internalizada. No sabemos si esto se debe a un procedimiento distinto a nivel metodológico; lo que sí sabemos es que las personas con Parkinson del estudio de Berger se ubicaban en los estadios 1 y 2 de la escala de Hoehny Yahr, mientras que la media de nuestro grupo se ubicó en $2,4(\pm 1,1)$, mostrando en general mayor severidad que aquellos participantes.

Salvando las diferencias, entonces, podemos suponer que los participantes de nuestro estudio mostraron una percepción del estigma como producto de tener EP menor que los participantes del estudio de Berger, a pesar de manifestar mayor severidad de la enfermedad y habiendo observado en este grupo que mayor severidad correlacionaba con mayor percepción del aislamiento social como dimensión del estigma.

Nuestros resultados mostraron que este grupo de participantes es consciente del estigma social como resultado de la enfermedad pero su percepción es relativamente baja; en general las medianas de las puntuaciones no superaron los primeros puntajes de la escala Likert (las medianas se posicionaron en 1 punto o, a lo sumo, 2 -de 4) y, cuando lo superaron (el caso de aislamiento social), fue solo por medio punto (mediana de 2,5 sobre el total 4). Observamos que la percepción del aislamiento social se correlacionó con mayor severidad de la enfermedad, mayor dosis de medicación antiparkinsoniana y más tiempo de evolución de la enfermedad. Asimismo, nuestros resultados mostraron que la percepción del estigma en la sub-dimensión vergüenza internalizada se asoció con el tiempo de evolución de la enfermedad y que la percepción de inseguridad financiera y rechazo social se asoció negativamente con la edad de los participantes. Estos resultados podrían relacionarse con la afectación de la EP en etapas relativamente tempranas de la vida, donde la severidad de la enfermedad y la toma de medicación (con sus efectos secundarios) pueden afectar el desempeño del rol laboral y social del enfermo de un modo más intenso y con mayores consecuencias que en edades avanzadas. Podría sugerirse que en estas etapas más tardías de la vida los síntomas de la EP pueden, en algunos casos, asemejarse (aunque de un modo más marcado y discapacitante) a los síntomas de los pares con edad avanzada y envejecimiento normal y el rol laboral y la estabilidad del empleo se supone que no están tan afectados.

Coherente con lo dicho anteriormente, la bibliografía analizada indica la afectación del rol social y laboral de las personas con enfermedades cónicas temen la EP por su potencialidad discapacitante (Soleimani y otros, 2016).

Conclusión

Los resultados mostrados nos indican que en este grupo de personas con EP sin condiciones de salud que puedan afectar la auto-crítica existe una percepción del estigma a raíz de tener EP que es relativamente baja.

Nos preguntamos si esto puede tener que ver con sus capacidades conservadas del movimiento que se ponen en juego en la práctica de la kinesia paradójica en el Taller de Parkinson, permitiéndoles mantener un rol social activo.

La anterior constituye una hipótesis de trabajo a poner a prueba mediante un estudio comparativo con un diseño de tipo experimental donde puedan incluirse personas que participan y que no participan del TdP y puedan controlarse las variables intervinientes.

Finalmente, cabe aclarar que la generalización de nuestros resultados es limitada.

Bibliografía

- 1- Peña-Nogales, Ó., Ellmore, T. M., de Luis-García, R. y otros (2019). "Longitudinal Connectomes as a Candidate Progression Marker for Prodromal Parkinson's Disease". *Front Neurosci*, 12:967. doi: 10.3389/fnins.2018.00967
- 2- Souques, A. A. (1921). "Rapport sur les syndromes parkinsoniens". *Revue Neurologique*, 37, 534-573
- 3- Bacigalupe, M. A. y Pujol, S. (2014). "El movimiento desde la perspectiva de la neurociencia social cognitiva: el caso de la Enfermedad de Parkinson". *Vertex*, 25, 429-436.
- 4- Hammarlund, C. S., Andersson, K., Andersson, M., y otros (2014). "The significance of walking from the perspective of people with Parkinson's disease". *J Parkinsons Dis*, 4:657-63. doi: 10.3233/JPD-140399.

- 5-Burgener, S. C. y Berger, B. (2008).“Measuring perceived stigma in persons with progressive neurological disease: Alzheimer’s dementia and Parkinson’s disease”. *Dementia*, 7:31-53. doi: 10.1177/1471301207085366
- 6- Maffoni, M., Giardini, A., Pierobon, A., y otros (2017).“Stigma Experienced by Parkinson’s Disease Patients: A Descriptive Review of Qualitative Studies”. *Parkinson’s Disease*, 2017 (art. 7203259):1-7 <https://doi.org/10.1155/2017/7203259>
- 7- Creswell, J. W. (2009).“Mixed Methods Procedures”. En Creswell, J. W. *Research design: Qualitative, quantitative and mixed methods approaches* (pp 203-224). 3ra ed. USA: SAGE
- 8- Fife, B. L. y Wright, E. R. (2000). “The dimensionality of stigma: A comparison of its impact on the self of persons with HIV/AIDS and cancer”. *Journal of Health and Social Behavior*, 41:50-67. doi: 10.2307/2676360
- 9-World Medical Association (2019). *WMA Declaration of Helsinki – Ethical principles for medical research involving human subjects*. The World Medical Association, Inc. Enlínea: <<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>>. Consultado el 1 de marzo de 2019
- 10-Soleimani, M. A., Bastani, F., Negarandeh, R. y otros (2016). “Perceptions of people living with Parkinson’s disease: a qualitative study in Iran”. *Br J Community Nurs*, 21:188-95

Coordinadora y compiladora

Prof. Dra. María Virginia Croce

Médica y Dra. En Medicina, Licenciada en Antropología – Universidad Nacional de La Plata.

Investigadora Principal de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Directora del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas – Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

Lista de autores

Abba, Martín Carlos

Licenciado en Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM).

Doctor en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Investigador independiente del CONICET.

Bacigalupe, María de los Ángeles

Profesora y Licenciada en Ciencias de la Educación y Doctora en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Profesora del Departamento de Ciencias de la educación, UNLP.

Investigadora Adjunta del CONICET.

Bernstein, Judith Celina

Médica y Doctora en Medicina, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Profesora Asociada de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP)

Jefa de la Unidad de Infectología, Hospital Zonal General de Agudos “Mi Pueblo”, Florencio Varela, provincia de Buenos Aires.

Médico de planta de la Unidad de Infectología, Hospital Zonal General de Agudos “Mi Pueblo”, Florencio Varela, provincia de Buenos Aires.

Cermignani, Luciano

Médico de la Universidad Nacional de La Plata, especialista en Clínica de la UBA y en Oncología de la UCA

Ayudante diplomado, Cátedra de Farmacología Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Cobos, Marisa M.

Médico y Doctor en Medicina de la Universidad Nacional de La Plata; Profesora de las Cátedras de Infectología y Trasplantes de Órganos y Tejidos, Jefe de Departamento de Tutorías y Directora de la Carrera de Especialización en Infectología de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

Flores, Luis Emilio

Bioquímico y Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Profesor de la Cátedra de Biología en la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Investigador de CONICET.

Gonzalez Baro, María del Rosario

Lic. en Biología y Dra. en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Profesora de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Gulayin, Pablo Elías

Médico, Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de La Plata

Especialista en Cardiología, Colegio de Médicos Distrito I Pcia. de Buenos Aires.

Magíster en Efectividad Clínica, Universidad de Buenos Aires.

Ayudante Diplomado Cátedra Salud Pública, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Lausada, Natalia

Méd. Veterinaria y Dra. en Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora de la Cátedra Trasplante de la Facultad de Ciencias Médicas UNLP.

Luna, Amalia

Médica de la Universidad de Buenos Aires (Facultad de Medicina, UBA)

Especialista en Dermatología de la UBA

Becaria de perfeccionamiento en Oncología cutánea y cirugía dermatológica del Instituto Universitario del Hospital Italiano de la ciudad de Buenos Aires.

Servicio de Dermatología del Hospital Italiano de la ciudad de Buenos Aires.

Maiztegui, Bárbara

Licenciada en Biología (orientación Zoología) y Doctora en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Profesora de la Cátedra de Biología en la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Investigador de CONICET

Molina, Nora Beatriz

Bioquímica. Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
Especialista en Microbiología Clínica. Colegio de Bioquímicos de la
Provincia de Buenos Aires.

Magister en Ciencias del Laboratorio Clínico (UNLP)
Docente de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias
Médicas (UNLP) y de la Escuela Universitaria de Recursos Humanos
del Equipo de Salud (UNLP).

Mosca, Susana M.

Investigador Principal del CONICET.
Profesora Adjunta de la Facultad de Ciencias Médicas y Profesora
Titular de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad
Nacional de La Plata (UNLP)

Pérez, Néstor Gustavo

Licenciado en Biología (Orientación Zoología) y Doctor en Ciencias
Naturales, Universidad Nacional de La Plata.
Profesor Asociado, Cátedra de Fisiología y Física Biológica, Facultad
de Ciencias Médicas de La Plata, Universidad Nacional de La Plata.
Investigador Independiente, Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas.

Plischuk, Marcos

Licenciado en Antropología y Doctor en Ciencias Naturales. Univer-
sidad Nacional de La Plata (UNLP).
Profesor de Citología, Histología y Embriología A en la Facultad de
Ciencias Médicas (UNLP); profesor de Antropología Biológica I en la
Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP).
Investigador Asistente del CONICET.

Pujol, Silvana

Médica y Doctora en Ciencias Médicas de la UNLP.

Especialista Jerarquizada en Psiquiatría y Psicología Médica (Colegio de Médicos de la Provincia de Buenos Aires).

Profesora de Psiquiatría, Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.

Rabassa, Martín Enrique

Médico de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Doctor en Medicina de la UNLP.

Profesor de Inmunología en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

Investigador Adjunto en la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Sparo, Mónica Delfina

Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA)

Especialista en Microbiología, Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Buenos Aires

Especialista en Microbiología Clínica, Asociación Argentina de Microbiología

Dra. de la UBA, Área Microbiología

Profesora de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Stagnaro, Juan Pablo

Médico, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Jefe de Trabajos Prácticos de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP)

Durante el segundo semestre del año 2018 la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas organizó el Primer Seminario de Investigación de esta Facultad con el objetivo de acercar la investigación científica a los estudiantes de grado.

Este volumen es una obra original donde se resumen algunas de las líneas de investigación presentadas por los invitados, docentes, investigadores científicos y tesis que realizan su actividad científica en la Facultad de Ciencias Médicas.

