

MARÍA VIRGINIA CROCE (compiladora)

Primer seminario de investigación científica en Ciencias Médicas

Volumen II


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



**Primer seminario de Investigación
Científica en Ciencias Médicas**

Volumen II

**Primer seminario de Investigación
Científica en Ciencias Médicas**

Volumen II

MARÍA VIRGINIA CROCE
(coordinadora)



Croce, María Virginia
Primer seminario de Investigación Científica en Ciencias Médicas:
volumen II / María Virginia Croce; Coordinación general de María
Virginia Croce. - 1a ed - La Plata: EDULP, 2025.
Libro digital, PDF/A

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-631-6568-46-5

1. Medicina. 2. Estrategias de la Investigación. I. Croce, María Virginia,
coord. II. Título.
CDD 610

Primer seminario de Investigación Científica en Ciencias Médicas

Volumen II

MARÍA VIRGINIA CROCE

(coordinadora)



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)

ISBN 978-631-6568-46-5

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723

© 2025 - Edulp

Impreso en Argentina

*A los investigadores, docentes, becarios y tesistas de la
Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP*

Agradecimientos

La Prof. Dra. María Virginia Croce expresa su especial agradecimiento a las autoridades de la Facultad de Ciencias Médicas por su apoyo en la organización de este seminario, al Prof. Dr. Martín Enrique Rabassa por su especial cooperación y al Sr. Leonardo Cotovic por su incondicional colaboración. Asimismo, agradece a todos los investigadores, docentes y tesisistas que desinteresadamente participaron del seminario comunicando sus líneas de investigación.

Índice

Prólogo	9
Estudio epidemiológico de infecciones del sitio quirúrgico (ISQ) relacionadas a cesáreas	11
<i>Bernan, Marisa</i>	
Infecciones de transmisión sexual y gesta no deseada en contexto de delitos de AS	23
<i>Bernstein, Judith Celina</i>	
Dinámica demográfica de las poblaciones humanas del noroeste de Patagonia y centro de Chile durante el Holoceno inferida a partir de dos líneas de evidencia independientes.....	41
<i>Cobos, Virginia Agustina</i>	
Factores inmunohistoquímicos pronósticos para las recidivas locales en las cirugías conservadoras del cáncer de mama	61
<i>Díaz, Pablo Javier</i>	
El ilion como elemento diagnóstico para la determinación de sexo en restos óseos de individuos subadultos. Aportes a la antropología forense	88
<i>García Mancuso, Rocío</i>	
Cicatrización y regeneración celular	106
Propuesta de un nuevo tratamiento para lesiones dérmicas crónicas	
<i>García, Marcela N.</i>	
Inmunoevasión y cáncer de mama	120
<i>Isla Larrain, Marina Teresita</i>	
Rol del gen RHBB2 en el cáncer colorrectal	138
<i>Lacunza, Ezequiel</i>	
Identificación y validación de ARNs largos no codificantes (LncRNAs) con implicancia clínica en el cáncer colorrectal y adenomas en el contexto de los subtipos moleculares consenso	157
<i>Lacunza, Ezequiel</i>	

Expresión de HLA-G en el Carcinoma Transicional de Vejiga.....	176
<i>Moavro, Damián Ezequiel</i>	
Resistencia antimicrobiana: ejemplo de una visión integral y microbiológica en el marco “Una Salud”. El caso de <i>Enterococcus spp</i>	190
<i>Schell, Celia María</i>	
Ética en investigación.....	207
<i>Stagnaro Plághos, Alba María</i>	
Funciones Biológicas de los Lípidos Nucleares.....	219
<i>Ves Losada, Ana</i>	
<i>Layerenza, Juan Pablo</i>	

Este libro es el segundo volumen de las exposiciones realizadas por algunos de los investigadores, docentes, becarios y tesistas durante el Primer Seminario Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas.

A partir de mi actuación en docencia, investigación y como Secretaria de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, desde 2018 tuve oportunidad de constatar que los estudiantes de pregrado desconocían la actividad científica que se realizaba en nuestra facultad. Con el objetivo de subsanar este hecho, organicé el Primer Seminario de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. De esta manera, consideré acercar la investigación científica y los científicos a los estudiantes y contribuir con la formación de los estudiantes desde esa Secretaría.

Desde los orígenes de nuestra facultad nunca se había realizado una actividad docente que tuviera ese objetivo, llegando posteriormente a constituirse en materia optativa. La propuesta fue recibida con gran entusiasmo por todos los claustros. Desde los primeros encuentros, los estudiantes colmaron el Aula Magna y los viernes después de las 17 horas se realizaron intensos encuentros.

En el año 2019 salió publicado el primer volumen del Primer Seminario Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas, donde se presentaron las exposiciones de ese primer período.

Inmediatamente después de la pandemia, continué organizando y presentando personalmente algunas de las líneas de investigación realizadas en nuestra facultad. Asimismo, invité a investigadores y docentes de otras facultades y universidades a comunicar su actividad científica.

En conjunto, los capítulos de estos dos volúmenes ofrecen una visión diferente del ámbito educativo clásico. Se trata de textos donde se recogen las exposiciones presentadas, que esbozan en forma clara y generalmente reducida algunos de los temas de la actividad científica principalmente, pero no exclusivamente, de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

Prof. Dra. María Virginia Croce



El Dr. Martín E. Rabassa y la Dra. María Virginia Croce en la presentación de uno de los seminarios

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE INFECCIONES DEL SITIO QUIRÚRGICO (ISQ) RELACIONADAS A CESÁREAS

Bernan, Marisa¹

Introducción

Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud (IACS) son un grave problema de salud pública y uno de los indicadores de la calidad de la asistencia médica en las instituciones de salud (Organización Panamericana de la Salud, 2011). En el HIGA San Roque de Gonnet una de las herramientas para evaluar los índices de riesgo de IACS son los cortes de prevalencia puntual que se realizan anualmente desde el año 2010. Este instrumento de vigilancia permite en forma rápida y económica analizar el impacto de los procedimientos vigilados y las tasas de IACS en cada área de internación, entre ellas las infecciones del sitio quirúrgico (ISQ) y proporciona datos homogéneos y comparables para nuestra Institución.

Las IACS constituyen un problema de salud pública, no sólo por su morbilidad, la prolongación de la estadía de los pacientes en los establecimientos de salud, la eventual discapacidad a largo plazo, la

¹ Médica, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Especialista Consultor en Infectología, Colegio de Médicos Distrito I. *Master in Public Health*, University of Pittsburgh, PA.USA. Profesora de Infectología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Jefe de Infectología del HIGA San Roque de Gonnet.

elevada tasa de mortalidad, sino también por las implicaciones económicas para los sistemas de salud.

Las IACS en los países europeos afecta en promedio 1 de cada 20 pacientes hospitalizados, lo que corresponde un total de 4,1 millones de paciente hospitalizados y 37.000 pacientes fallecen a causa de estas infecciones (Organización Panamericana de la Salud, 2014; Organización Mundial de la Salud, 2016; Galván *et al.*, 2017). Datos de Canadá refiere que adquieren 220.000 infecciones hospitalarias anuales y 8.000 de estos pacientes mueren por esta causa. En los Estados Unidos los costos médicos están entre 35 y 45 mil millones de dólares (Dahlke *et al.*, 2013; Dodd *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018).

En los países de ingresos bajos y medios, las dificultades son mayores por el deficiente estado de las infraestructuras y problemas relacionados con la higiene y el saneamiento (Martinez Martinez, 2018; Fahmy *et al.*, Sienko *et al.*, 2019; Ramírez-Salinas *et al.*, 2016; Cabrera Palomino, 2019; Sobhy, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en dichos países la frecuencia de las infecciones adquiridas en las unidades de cuidados intensivos (UCI) es al menos 2 o 3 veces mayor que en los países de altos ingresos y que la cantidad de infecciones asociadas a dispositivos podría ser hasta 13 veces mayor que en EE. UU. (Organización Mundial de la Salud, 2016; Dodd, 2017; Liu, 2018). En América Latina existen trabajos puntuales y algunos países, como por ejemplo México, publica reportes de IACS que van de 5% hasta el 19% (Martinez Martinez, 2018; Fahmy *et al.*, Sienko *et al.*, 2019; Ramírez-Salinas *et al.*, 2016; Cabrera Palomino, 2019).

Debido a esto, la OMS y Organización Panamericana de la Salud (OPS), han integrado proyectos para disminuir las IACS dentro de los hospitales instalando programas de prevención y control de infecciones (Lopardo y Miller, 2015; Tita *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2013; Bratzler *et al.*, 2013; Hadiati, 2020). Un componente fundamental en los programas de prevención y control de infecciones asociados a los cuidados de la salud (IACS) es la vigilancia intensificada. Ello permite conocer la real magnitud de esta problemática en cada institución de

salud y realizar investigaciones epidemiológicas para determinar sus causas, así como identificar e implementar medidas de prevención y control. Los estudios de incidencia son instrumentos muy útiles en estos programas, permitiendo determinar el riesgo de adquirir una de estas infecciones en determinado tiempo, lugar y grupo estudiado. La vigilancia epidemiológica de las tasas de infección del sitio quirúrgico (ISQ) relacionada a cirugías limpias es uno de los parámetros de la calidad de atención en una institución de salud. Las cesáreas son cirugías, en su mayoría, limpias, con un riesgo estimado de infección que no debiera superar el 5%.

En el año 2015, en el corte de prevalencia puntual de IACS realizado anualmente en nuestro hospital, se evidenció una tasa % de ISQ inusualmente alta relacionada a cesáreas y se decidió iniciar la vigilancia intensificada de estas cirugías a partir de enero del año 2016 a fin de conocer la incidencia y caracterizar los factores determinantes de dichas infecciones.

Objetivos

Objetivo general

- Cuantificar las tasas de incidencia mensual y anual de las infecciones relacionadas a las cesáreas realizadas en el servicio de Obstetricia del hospital.

Objetivos específicos

- Analizar los factores de riesgo prevalentes de dichas infecciones.
- Estudiar los microorganismos y sensibilidad antibiótica prevalente de las mismas.

Metodología

Estudio epidemiológico prospectivo, observacional, descriptivo, de incidencia, entre enero del año 2016 y el 31 de diciembre del año 2019.

El mismo se desarrolla en el Hospital Interzonal General de Agudos San Roque de Gonnet, en el servicio de Obstetricia. Se registran y analizan los datos del total de nacimientos institucionales, el porcentaje de los asistidos por cesárea y todas las infecciones del sitio quirúrgico detectadas en estas cirugías durante el período. Los datos se obtienen de las historias clínicas y registros de consultorio de puerperio, si la infección se detectase hasta 30 días posterior a la cirugía, luego del alta hospitalaria. Se relevan datos filiatorios, fecha de la cirugía, indicación de la cesárea, urgencia en la indicación, uso de la profilaxis antibiótica y otras condiciones que predisponen a ISQ como la ruptura prematura de membranas, las infecciones urinarias durante la gestación ó la detección de *Streptococcus agalactiae* en el hisopado vaginal-anal que se realiza en las semanas 35 a 37 del embarazo. También fueron analizados los cultivos microbiológicos del sitio quirúrgico, los gérmenes aislados y la sensibilidad antibiótica de los mismos. Para el registro, el análisis estadístico, las tablas y los gráficos se utilizó el programa Excel.

Resultados

Desde enero del año 2016 hasta diciembre del año 2019 se registraron un total de 107 infecciones sobre un total de 2063 cesáreas realizadas en el período (5,18%)

En 2016 la tasa de incidencia anual de ISQ alcanzó el 8,7% descendiendo a 4,6%, 5% y 2,4% en los años sucesivos. Grafico1

Se observó un incremento anual y sostenido del porcentaje de las cesáreas sobre los partos. En 2016 las cesáreas representaron el 29,5% del total de los nacimientos institucionales, en 2017 el 33,8%, en 2018 el 34,2% y en el 2019 el 39%. Gráfico2

Las causas de indicación de cesárea en quienes tuvieron ISQ fueron: 49 pacientes (45,8%) con falta de progresión en el trabajo de parto, 25 pacientes (23,4%) con dilatación estacionaria del cuello uterino y 24 pacientes (22,4%) el haber tenido cesáreas anteriores y otras causas 9 (8,4%). Grafico3

Del total de las 107 ISQ, 72 (67%) fueron cesáreas realizadas de urgencia y 35 (33%) fueron cesáreas programadas. Todas las pacientes recibieron una mono dosis de profilaxis antibiótica con cefazolina, previa a la incisión.

21 pacientes (20%) presentaron ruptura prematura de membranas previa. Las pacientes con cesáreas infectadas en quienes fueron detectadas infecciones urinarias en la gestación fueron 5 (4,67%) y se detectó *Streptococcus agalactiae* durante el embarazo en 4 (3,74%).

Se obtuvieron muestras para estudio microbiológico en 98 de las 107 ISQ. Del total de muestras microbiológicas en 80 (82%) se detectó desarrollo de *Staphylococcus aureus* sensible a Cefalosporinas de primera generación.

Los datos del número de partos, número de cesáreas, número de las ISQ y las tasas% de las ISQ en cada mes y años estudiados se presentan en las siguientes tablas:

Tablas

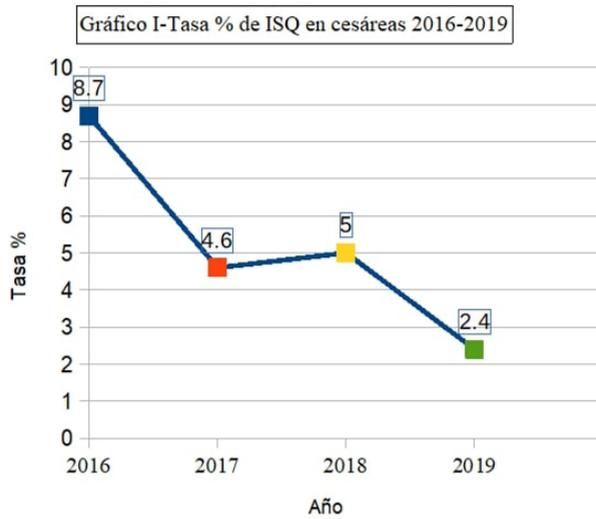
Tabla1-Año 2016										
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Cesáreas realizadas	36	42	38	41	46	27	48	39	43	53
Número de ISQ	4	2	2	3	1	4	4	6	6	7
Nacimientos	129	122	119	123	166	116	134	122	134	176
(% cesáreas)	27,9%	34,4%	31,9%	33,3%	27,7%	23,3%	35,8%	32,00%	32,00%	30,00%
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Tasa % ISQ cesáreas	11%	4.76%	5.26%	7.30%	2%	14.80%	8.30%	15%	14%	13.20%

Tabla2-Año 2017										
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Cesáreas realizadas	44	49	48	47	37	37	35	37	48	39
Número de ISQ	2	2	4	3	0	1	2	3	2	2
Nacimientos	129	134	141	117	129	129	116	112	122	123
(% cesáreas)	33,8%	36,6%	34	40,2%	28,7%	28,7%	30,2%	33,3%	39,3%	31,7%
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Tasa % ISQ cesáreas	4.50%	4.10%	8.30%	6.40%	0%	2.70%	5.70%	8.10%	4.10%	5.10%

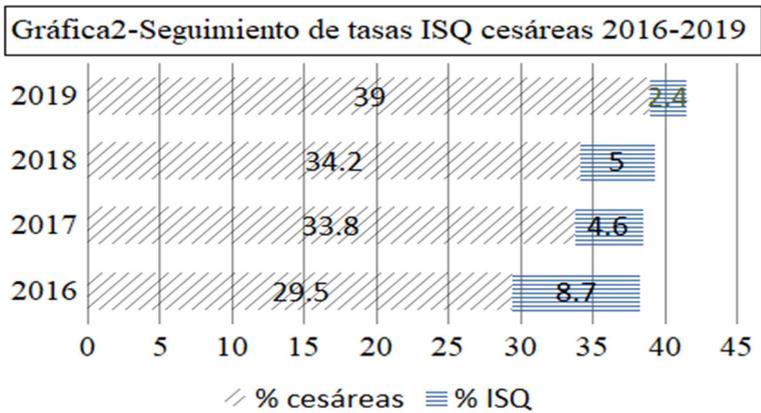
Tabla3-Año 2018										
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Cesáreas realizadas	53	37	53	52	42	35	51	43	32	31
Número de ISQ	2	3	1	5	5	2	1	2	3	1
Nacimientos	149	105	140	147	115	115	120	125	108	115
(% cesáreas)	35,6%	35,2%	38,2%	35,6%	36,5%	30,5%	42,5%	34,4%	29,6%	26,95
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Tasa % ISQ cesáreas	3.80%	8.00%	1.90%	9.60%	11,9%	5.70%	1.96%	4.65%	9.37%	3.22%

Tabla4-Año 2019										
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Cesáreas realizadas	60	46	41	58	42	44	50	38	43	48
Número de ISQ	2	0	0	3	1	1	2	0	1	2
Nacimientos	148	112	135	136	110	116	117	116	96	104
(% cesáreas)	40,5%	41,00%	30,4%	42,7%	37,3%	38,00%	42,75%	32,6%	44,8%	46,1%
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Tasa % ISQ cesáreas	3.30%	0.00%	0.00%	5.20%	2.4%	2.30%	4.00%	0.00%	2.30%	4.16%

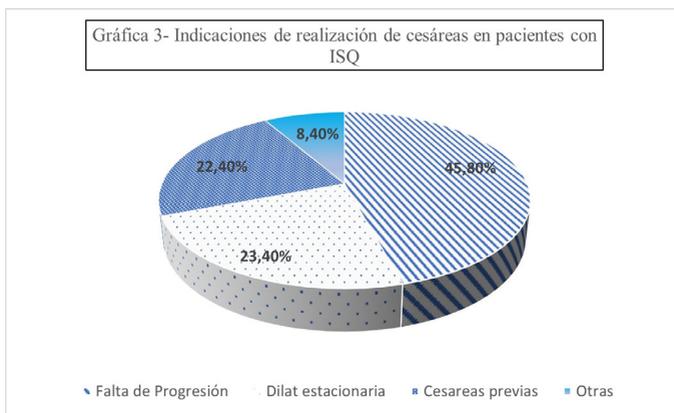
Gráfica 1



Gráfica 2



Gráfica 3



Conclusiones

En el período estudiado se observó un incremento anual y sostenido en el porcentaje de cesáreas sobre los partos en los nacimientos institucionales. Se detectaron desde enero 2016 hasta diciembre de 2019 un total de 107 cesáreas infectadas sobre un total de 2063 cesáreas realizadas. La tasa % de incidencia acumulada de ISQ fue de 5,18% en el período. En 2016 la tasa anual de ISQ alcanzó el 8,7% descendiendo a 2,4% en 2019. Las causas prevalentes de indicación para realizar cesárea en aquellas pacientes que presentaron ISQ fueron la falta de progresión en el trabajo de parto, la dilatación estacionaria del cuello del útero y el haber tenido cesáreas anteriores. En 2/3 de los casos las cesáreas que se infectaron fueron realizadas de urgencia y 1/5 tenían como antecedente la ruptura prematura de membranas. Las pacientes con infecciones urinarias y/ o la detección de *Streptococcus agalactiae* detectados durante el embarazo representaron menos del 5% de las cesáreas infectadas. Todas las pacientes recibieron la profilaxis anti-biótica recomendada.

De las muestras de cultivo de herida realizadas el 82% tuvo aislamiento de *Staphylococcus aureus* sensible a Cefalosporinas de primera generación.

Al realizar la vigilancia intensificada pudimos detectar precozmente los desvíos en las tasas y aplicar medidas de prevención y control que permitieron disminuir las ISQ y mantenerlas dentro de las recomendaciones nacionales e internacionales.

Referencias bibliográficas

- Actualización sobre medidas de Prevención de infecciones de sitio quirúrgico. https://codeinep.org/wp-content/uploads/2019/09/DOCUMENTO-FINAL_PREVENCION_ISQ-2.pdf
- Blanc, J.; Rességuier, N.; Loundou, A.; Boyer, L.; Auquier, P.; Tosello, B.; d'Ercole, C. (2021). Morbilidad materna grave en el parto por cesárea prematura: revisión sistemática y metanálisis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021 junio; 261: 116-123. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.04.022. Epub 2021 21 de abril. PMID: 33932682.
- Bratzler, D. W.; Dellinger, E. P.; Olsen, K. M.; Perl, T. M.; Auwaerter, P. G.; Bolon, M. K.; Society for Healthcare Epidemiology of America. (2013). Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 70(3), 195– 283. <http://doi.org/10.2146/ajhp120568>.
- Cabrera Palomino, E.B. (2019). Factores obstétricos implicados en la aparición de infección de sitio quirúrgico en mujeres sometidas a cesárea. *Rev Peru Investig Matern Perinat.* 8(3):17-20.
- Dahlke, J.D.; Mendez-Figueroa, H.; Rouse, D.J.; Berghella, V.; Baxter, J.K.; Chauhan, S.P. (2013). Evidence-based surgery for cesarean delivery: an updated systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* Oct;209(4):294-306.
- Deng, B.; Li, Y.; Chen, J.Y.; Guo, J.; Tan, J.; Yang, Y.; Liu, N. (2022). Modelos de predicción del parto vaginal después del parto por cesárea:

- una revisión sistemática. *Int J Enfermeras Stud.* 7 de septiembre de 2022; 135: 104359. doi: 10.1016/j.ijnurstu.2022.104359. Epub antes de la impresión. PMID: 36152466.
- Dodd, J.M.; Crowther, C.A.; Grivell, R.M.; Deussen, A.R. (2017). Cesárea repetida electiva versus inducción del trabajo de parto para mujeres con un parto por cesárea anterior. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jul 26;7(7):CD004906. doi: 10.1002/14651858.CD004906.pub5. PMID: 28744896; IDPM: PMC6483152.
- Fahmy, W.M.; Crispim, C.A.; Cliffe, S. (2018). *Asociación entre muerte materna y cesárea en América Latina: una revisión sistemática de la literatura.* Partería. 2018 abril; 59: 88-93. doi: 10.1016/j.midw.2018.01.009. Epub 2018 31 de enero. PMID: 29421643.
- Galván, M.; Castañeda, L.; Galindo, M.; Morales, M. (2017). Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia antimicrobiana. Infections associated with healthcare and antimicrobial resistance. *Rev Esp Méd Quir.*;22(1):1-13.
- Hadiati, D.R.; Hakimi, M.; Nurdianti, D.S.; Masuzawa, Y.; da Silva Lopes, K.; Ota, E. (2020). Preparación de la piel para prevenir infecciones después de una cesárea. *Cochrane Database Syst Rev.* Jun 25;6(6):CD007462. doi: 10.1002/14651858.CD007462.pub5. PMID: 32580252; IDPM: PMC7386833.
- Liu, Z.; Dumville, J.C.; Norman, G.; Westby, M.J.; Blazeby, J.; McFarlane, E. *et al.* (2018). Intraoperative interventions for preventing surgical site infection: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018, Issue 2. Art. No.: CD012653. DOI: 10.1002/14651858.CD012653.pub2.<https://www.cochrane-library.com/cdsr/doi/10.1002/14651858>.
- Lopardo, G.; Miller, L. (dir.) (2015). Actualización sobre medidas de Prevención de infecciones de sitio quirúrgico. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Disponible en: https://codeinep.org/wp-content/uploads/2019/09/DOCUMENTO-FINAL_PREVENCION_ISQ-2.pdf

- Martinez Martinez, C.; Garcia de la Torre, J.L.; Cepeda Nieto, A.C. (2018). Evaluación de infecciones poscesárea mediante la implementación de un programa preventivo. *Ginecol Obstet Mex.* 2018 abril;87(4):228-233.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Recomendaciones de la OMS para la prevención y el tratamiento de las infecciones maternas en el parto: resumen de orientación. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205685>
- Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Módulos de principios de epidemiología para el control de enfermedades*. Unidad 4: Vigilancia en salud pública. Segunda Edición Revisada. ISBN 92 75 32407 7
- Organización Panamericana de la Salud. (2014). *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud en el puerperio*. Módulo V. Washington, DC. ISBN 978-92-75-31835.
- Ramírez-Salinas, Y.; Zayas-Illas, A.; Infante-del-Rey, S.; Ramírez-Salinas, Y.; Mesa-Castellanos, I.; Montoto-Mayor, V. (2016). Infección del sitio quirúrgico en púerperas con cesárea. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* [Internet] [citado 1 Oct 2022]; 42 (1) Disponible en: <http://www.revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/35>
- Sienko, G.; Ospina, R.; Fernández, C.; Pavan, J.; García Allende, H.; Cannistraci Giolito, R. (2019) Infecciones del sitio quirúrgico en púerperas cesareadas en una Maternidad de Córdoba. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* [Internet]. 8 de octubre de 2019 [citado 1 de octubre de 2022];76(Suplemento). Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/25624>
- Sobhy, S.; Arroyo-Manzano, D.; Murugesu, N.; Karthikeyan, G.; Kumar, V.; Kaur, I.; Fernandez, E.; Gundabattula, S.R.; Betran, A.P.; Khan, K.; Zamora, J.; Thangaratinam, S. (2019). Mortalidad materna y perinatal y complicaciones asociadas con la cesárea en bajos -Países de ingresos y de ingresos medios: una revisión sistemática y un metanálisis. *Lanceta*. 11 de mayo de 2019; 393 (10184):

- 1973-1982. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32386-9. Epub 2019 28 de marzo. PMID: 30929893.
- Sun, J. *et al.* (2013). Administración profiláctica de cefazolina antes de la incisión en la piel versus antibióticos en el pinzamiento del cordón para prevenir la morbilidad infecciosa poscesárea: una revisión sistemática y metanálisis de ensayos controlados aleatorios. *Gynecol Obstet Invest*; 75:175–178.
- Tita, A. T. N., Owen, J., Stamm, A. M., Grimes, A., Hauth, J. C., & Andrews, W. W. (2016). Impact of extended-spectrum antibiotic prophylaxis on incidence of post cesarean surgical wound infection. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 199(3), 303.e1–303.e3. <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.06.068>
- Wang, L.H.; Seow, K.M.; Chen, L.R.; Chen, K.H. (2020). El impacto en la salud de las técnicas quirúrgicas y los métodos de asistencia utilizados en los partos por cesárea: una revisión sistémica. *Int J Environ Res Salud Pública*. 21 de septiembre; 17 (18): 6894. doi: 10.3390/ijerph17186894. PMID: 32967222; PMCID: PMC7558715.
- Zejnullahu, V. A.; Isjanovska, R.; Sejfića, Z.; Zejnullahu, V. A. (2019). Surgical site infections after cesarean sections at the University Clinical Center of Kosovo: rates, microbiological profile and risk factors. *BMC infectious diseases*, 19(1), 1-9.

INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL Y GESTA NO DESEADA EN CONTEXTO DE DELITOS DE AS

Bernstein, Judith Celina¹

Introducción

Los delitos de AS (DAS) son un fenómeno complejo que afecta principalmente a mujeres, adolescentes y niños/as en forma desproporcionada, para los cuales esta situación implica una experiencia traumática que interfiere de un modo directo en su vida y en el caso de los/as niños/as, en el desarrollo evolutivo normal psico-físico. El abuso sexual (AS) se define como cualquier forma de contacto sexual entre dos personas sin el consentimiento de una de ellas, o mediada por un diferencial de poder entre la víctima y el agresor/a, sin importar la edad, condición socioeconómica y cultural. Es una de las más graves violaciones a los derechos humanos ya que violenta la integridad, dignidad, autoestima y desarrollo integral de las víctimas; pero además, es una problemática que generalmente se mantiene en la clandestinidad, en una *cultura de silencio*, lo que imposibilita conocer su magnitud. La prevalencia real de los DAS se desconoce, aunque es una

¹ Médica y Doctora en Medicina, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Investigadora del Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos. Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Jefa de la Unidad de Infectología, Hospital Zonal General de Agudos “Mi Pueblo”, Florencio Varela, provincia de Buenos Aires.

realidad para millones de personas, sobre todo para las poblaciones vulnerables. Se trata de una problemática multicausal, entre las que se destacan los roles de poder en una familia, la negligencia y descuido de padres, madres o responsables de la protección de las/os menores de edad, el machismo, la discriminación de género, la falta de oportunidades educativas y la pobreza.

En el contexto de los DAS pueden ocurrir infecciones de transmisión sexual (ITS) y gestación no deseada (GND). Resulta fundamental poder distinguir entre las ITS diagnosticadas en la primera consulta y aquellas encontradas durante el seguimiento, ya que el diagnóstico realizado durante el seguimiento posterior a la primera consulta implica que la ITS adquirida ha sido en el contexto del hecho de abuso/violencia sexual.

Por otra parte, la prevención de ITS y GND requiere de una intervención rápida y eficaz. En el municipio de Florencio Varela, situado en el conurbano sur de la provincia de Buenos Aires, la atención de las víctimas de DAS se realiza inicialmente en el Servicio de Emergencias o en la Unidad de Infectología del Hospital Zonal General de Agudos “Mi Pueblo” (HMP) de Florencio Varela; posteriormente, se hace la derivación a los Servicios de Salud Mental y Ginecología para el abordaje transdisciplinario de las/os pacientes y completar así la evaluación y seguimiento de los casos.

Luego de la culminación del aislamiento social preventivo y obligatorio (ASPO) decretado por la pandemia de CoViD-19 y tras la apertura institucional de los consultorios externos, se observó un incremento en el número de consultas hospitalarias por DAS, ya sea por demanda espontánea, por derivación de otros Servicios de Salud o del Cuerpo Médico Forense. Se evidenció entonces una carencia de registros y datos oficiales en el municipio que permitieran estimar la dimensión cuali-cuantitativa de esta problemática. De dicha necesidad surgió este estudio, el cual determina un enfoque centrado en las personas, tendiente a obtener información sobre la problemática de ITS y GND en el contexto de DAS en el municipio de Florencio Varela.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el tipo de ITS y la prevalencia de ITS y GND en personas víctimas de DAS que acuden al Consultorio Externo de la Unidad de Infectología del HMP.

Objetivos específicos

- Describir las características demográficas relacionadas en esa población.
- Identificar las formas de AS contra las víctimas de DAS.
- Determinar el número de episodios de AS sufridos por las víctimas.
- Conocer el lugar donde se produjo el DAS.
- Conocer el vínculo entre agresores y víctimas de DAS.
- Controlar el cumplimiento del calendario nacional de vacunación en las víctimas de DAS.
- Determinar el momento en que se realizó la primera consulta médica o basal posterior al abuso.
- Conocer el número de víctimas a las cuales se les indicó la quimioprofilaxis (QP) contra las ITS y la anticoncepción hormonal de emergencia (AHE).
- Establecer la prevalencia de las ITS: sífilis, infección por VIH, hepatitis B y hepatitis C en la víctima al momento de la consulta médica basal.
- Investigar el contagio de sífilis, infección por VIH, hepatitis B y hepatitis C y la GND mediante el seguimiento y controles clínicos y de laboratorio de la víctima.

Pacientes y métodos

Se realizó un estudio de intervención, de diseño prospectivo, llevado a cabo desde septiembre de 2021 a marzo de 2023. El presente trabajo de investigación y el consentimiento informado (CI) para la participación del paciente en el estudio fue evaluado por el Comité de Bioética y Ética de la Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Para cumplir con los objetivos del estudio se confeccionó una historia clínica detallada con las variables a investigar, donde se asentaron los datos de inicio y seguimiento de los pacientes. Los datos obtenidos se registraron en una base confeccionada con el programa Excel®, la cual se utilizó para su análisis posterior.

El universo o población objetivo fueron varones, mujeres, niñas/os y adolescentes víctimas de DAS que consultaron en la Unidad de Infectología del HMP.

Se consideraron criterios de inclusión a todos los pacientes hombres, mujeres, niños/as y adolescentes de cualquier edad, nacionalidad y género víctimas de DAS, que concurren a atenderse en la Unidad de Infectología del HMP, residentes en el municipio de Florencio Varela y que firmaron el CI. Y como criterios de exclusión a los pacientes que no quisieron firmar el CI y que no residían en Florencio Varela.

El reclutamiento de los pacientes se realizó por demanda espontánea, ya sea por derivación de un Servicio de Salud u otras instituciones. La consulta inicial o basal (CB) con el paciente estuvo a cargo de la médica infectóloga; luego se realizaba la derivación a los servicios de Salud Mental y Trabajo Social del HMP.

En la CB se le brindaba al paciente un cronograma impreso con las fechas y horario en las que debía realizar los controles clínicos y de laboratorio. Aquellos pacientes que no concurren a la segunda consulta fueron contactados por la Trabajadora Social de la Unidad.

La población accesible y la muestra correspondieron en este caso a las unidades de análisis, ya que se seleccionaron a todos los pacientes

que cumplían con los criterios de inclusión del estudio. No se calculó el tamaño muestral porque se trabajó con el universo. Se resumieron las variables dicotómicas en porcentajes y se presentaron en gráficos de tortas y barras.

Para el manejo médico de las víctimas de DAS que concurren al HMP, se siguió con los siguientes pasos:

- Tratamiento de las lesiones corporales y genitales.
- AHE: se indicó levonorgestrel hasta 5 días posteriores a la exposición sexual.
- Profilaxis de las ITS: para la quimioprofilaxis (QP) se utilizaron distintos esquemas que incluyeron ceftriaxona o cefixima, azitromicina o doxiciclina y metronidazol. En cuanto a la profilaxis posexposición (PPE) sexual para VIH, se indicó hasta un máximo de 72 horas luego de la exposición sexual, con distintos esquemas de terapia antiretroviral: Tenofovir/Emtricitabina o Tenofovir/ Lamivudina + Darunavir/Ritonavir/tenofovir o Dolutegravir o Raltegravir.
- Chequeo del estado de inmunizaciones: se completó el calendario según la edad.
- Seguimiento médico (Tabla 2). El seguimiento clínico de los y las pacientes se realizó en la CB y a las 2, 6 y 12 semanas posteriores al abuso. Se solicitó estudio de la función hepática y renal, así como el dosaje de hormona gonadotrofina coriónica subunidad beta (HGC β) en la CB y a las 2 y 6 semanas posteriores. Se solicitó la investigación de ITS en la CB y a las 6 y 12 semanas posteriores, mediante las siguientes determinaciones serológicas: *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL), anticuerpos treponémicos, enzima inmuno ensayo de cuarta generación (ELISA) para VIH, antígeno de superficie para hepatitis B (HBsAg), anticore para hepatitis B (HBcAc) y anticuerpos para hepatitis C (HCVAc).

Resultados

Durante el período mencionado se atendieron 120 pacientes víctimas de DAS, de las cuales el 92% (n=110) fueron mujeres.

Al analizar los datos por grupo etario, se observó que el 27% (n=32) de las víctimas tenían hasta 10 años de edad; 34% (n=41) de 11 a 14 años; 15% (n=18) de 15 a 18 años y 24% (n=29) más de 18 años; el 61% (n=73) de las víctimas eran niños y niñas de 1 a 14 años de edad (Figura 1).

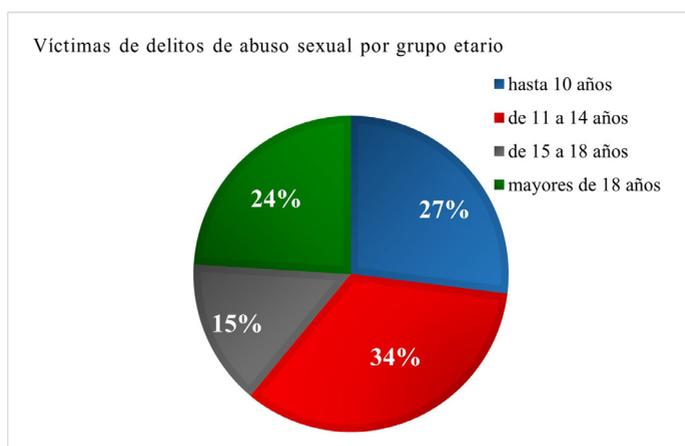


Figura 1. Víctimas de delitos de abuso sexual distribuidas por grupo etario. Septiembre de 2021 a marzo de 2023. Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Refirieron haber padecido un solo episodio de abuso el 64% (n=77) de las víctimas y el 36% (n=43) dos o más episodios (Figura 2).

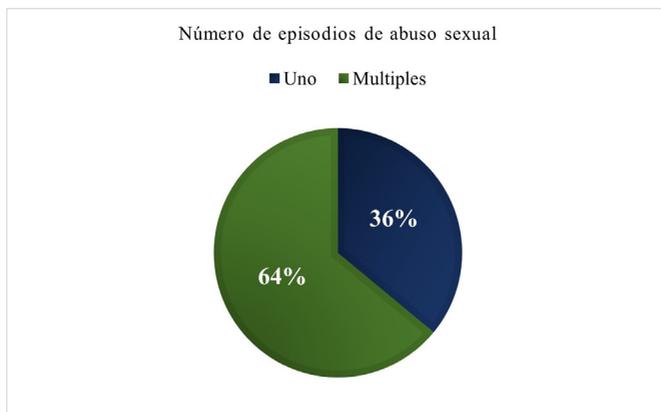


Figura 2. Número de episodios de abuso sexual. Septiembre de 2021 a marzo de 2023. Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Considerando el sexo de los agresores, el 98% (n=118) fueron hombres y solo 2 fueron mujeres, madres de las víctimas en ambos casos.

Con referencia a la forma de abuso referida, el 78% (n=94) sufrió violación con penetración genital, el 14% (n=17) refirió solo tocamiento y un 8% (n=9) no supo precisar.

Se observó que el 62% (n=75) de los abusos ocurrieron en el hogar de las víctimas, un 35% (n=42) en el hogar del agresor y solo un 3% (n=3) en la vía pública.

Se identificó que el 86% (n=103) de los atacantes eran personas conocidas de las víctimas. En cuanto al vínculo de la víctima con el agresor/agresora del entorno familiar, en el 32% (n=39) de los casos el atacante fue el padrastro, en el 20% (n=24) tío, 16% (n=19) padre biológico, 16% (n=19) primo, 8% (n=9) abuelo, 4% (n=5) la madre y 4% (n=5) un hermano (Figura 3).

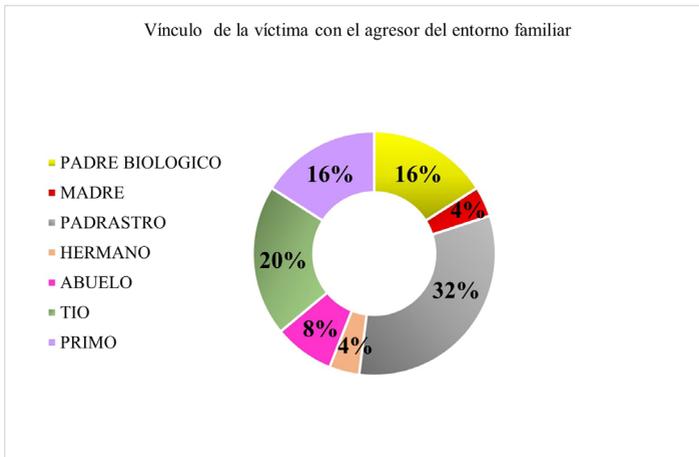


Figura 3. Vínculo de la víctima con el agresor del entorno familiar. Septiembre de 2021 a marzo de 2023. Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, Argentina.

En el caso del atacante conocido que no era del entorno familiar, un 50% (n=60) era amigo de la víctima o del entorno familiar, un 25% (n=30) era la pareja de la madre y el otro 25% (n=30) un vecino del hogar.

El 91% (n=109) de los pacientes no presentaron libreta sanitaria (LS) al momento de la CB, por lo que no pudo constatar si la vacunación estaba completa o incompleta. Solo un 9% (n=11) de los pacientes presentó la LS y en ellos se constató vacunación completa en un 6% (n=7) e incompleta en un 3% (n=2).

La primera consulta médica luego de ocurrido el episodio de abuso se realizó luego de haber transcurrido 96 horas o más en el 76% (n=91) de los casos; un 5% (n=6) consultó entre las 72 y 96 horas; un 2% (n=3) entre las 48 y 72 horas; un 8% (n=9) consultó entre las 36 y 48 horas; y un 2% (n=3) entre las 12 y las 24 horas. No hubo consultas entre las 24 y 36 horas ni a menos de 12 horas de ocurrido el acto de abuso y un 7% (n=8) no supo precisar cuándo había sido el episodio de abuso (Figura 4).

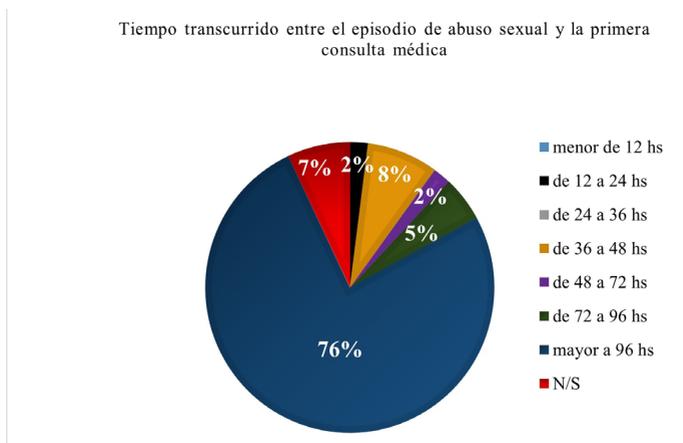


Figura 4. Tiempo transcurrido entre el episodio de abuso sexual y la primera consulta médica. Septiembre de 2021 a marzo de 2023. Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, Argentina.

El 71% (n=85) de las víctimas tenía indicación de recibir QP para ITS y AHE en la CB. Sin embargo, a un 52% (n=44/85) de las víctimas no les fue suministrada.

Solo el 61% (n=73) de los pacientes atendidos concurren a realizarse los controles médicos indicados. Al momento de la primera consulta médica o CB no se hallaron ITS ni embarazo en los pacientes. Durante los controles subsiguientes, se diagnosticaron producto del AS, 4 casos de sífilis: 2 casos en niñas de 9 y 12 años, 1 caso en una mujer de 24 años y un caso en 1 niño de 5 años. La paciente de 12 años con sífilis tuvo una GND que culminó en un aborto espontáneo. En todos estos casos los pacientes no habían recibido la QP para ITS y GND.

Discusión

Los delitos de agresión sexual (DAS) comprenden cualquier atentado contra la libertad. Atraviesan transversalmente a la sociedad, ocu-

rriendo generalmente en el ámbito más cercano de la víctima. Son actos usualmente ocultados o negados, lo que coloca a las víctimas en una situación de gran vulnerabilidad, dejándolas frecuentemente solas frente a las consecuencias del abuso, por lo que los efectos de la agresión se profundizan por la vergüenza, la falta de credibilidad y el aislamiento.

Los DAS pueden ocurrir en distintos contextos; los agresores pueden ser personas del entorno familiar; pueden ser allegados, o adultos a cargo del cuidado de la víctima, o bien pueden ser extraños y desconocidos. En este estudio la mayoría de los casos de AS ocurrieron en el hogar del agresor y fueron realizados por hombres intrafamiliares, siendo el padrastro conviviente del hogar el atacante reportado de mayor prevalencia. En los DAS extrafamiliares, en la mitad de los casos denunciados el atacante era amigo de la víctima.

Los DAS pueden tratarse de situaciones iniciadas en edades muy tempranas y que aún continúan de modo crónico y repetitivo, de situaciones esporádicas o pueden ser situaciones que se dan una única vez. En la población estudiada, la mayoría de las víctimas presentaron historia de múltiples episodios de AS ocurridos a lo largo de su vida, los cuales habían comenzado en la infancia y se habían sostenido durante años. Los casos reportados de AS constituyen una proporción ínfima de los que realmente tienen lugar, por lo que son considerados únicamente como la punta visible de un *iceberg* cuyo problema mayor permanece oculto.

Las víctimas son mayoritariamente mujeres, niñas/os y adolescentes. En nuestro estudio, la mayoría de las víctimas fueron mujeres adolescentes y niños/as de hasta 14 años de edad, lo que concuerda con el reporte de la OPS/OMS del 9 de marzo de 2021, el cual informó que la violencia contra la mujer se empieza a sufrir a edades alarmantemente tempranas; cerca de 736 millones de mujeres sufren violencia física o sexual infligida por un compañero íntimo o agresiones sexuales perpetradas por otras personas, cifras que se han mantenido estables a lo largo del decenio más reciente.

De acuerdo al *Sistema Nacional de Estadística Criminal* perteneciente al Ministerio de Seguridad de la Nación Argentina, los delitos contra la integridad sexual a nivel país muestran en la serie del último quinquenio oscilaciones en torno a los 14.500 hechos y 15.400 víctimas por año. Los DAS representan el 1% del total de delitos registrados en el país, aunque esta cifra no refleja cabalmente su relevancia, dado que estudios efectuados con otras metodologías (como la Encuesta Nacional de Victimización) advierten sobre la muy baja tasa de denuncia del fenómeno, en comparación con otros tipos de delitos. En la serie histórica se destaca un primer pico en el año 2015, coincidente con la irrupción del “*Ni una Menos*” como movimiento de denuncia de la violencia machista en Argentina, ubicándose como el período anual con mayor cantidad de víctimas registradas. El año 2018 presenta el registro más elevado dentro del período 2014-2018 (con 16.974 víctimas). En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, en el año 2018, un 39% de los delitos contra la integridad sexual correspondieron a menores de 13 años de edad.

No hay en Argentina ningún organismo público que sistematice a nivel nacional los datos provenientes de las distintas instituciones donde se atienden a las víctimas de los DAS. Entre los problemas detectados para estimar la dimensión cuantitativa de esta problemática, se constató que tanto los hospitales como los Centros de Atención Primaria de la Salud no sistematizan ni publican los registros de los casos de demandas de asistencia. Los datos existentes, dispersos, fragmentados, confirman que Argentina presenta las mismas tendencias que se observan en otros países, y aunque los datos disponibles no permiten determinar la incidencia o prevalencia del fenómeno a nivel nacional, es posible tener una pauta de su presencia en diversos contextos. Por ello, la problemática de los DAS debe abordarse como un tema prioritario de las políticas públicas; dada su gravedad, debe dar lugar a acciones y programas de prevención, asistencia, protección integral y sanción con fuerte voluntad política.

Por otra parte, entre las consecuencias físicas de los DAS podemos mencionar a las ITS, GND, pérdida del control de esfínteres, dolores crónicos generales, hipocondría, dolor gastrointestinal. Se han comunicado un sinnúmero de consecuencias conductuales y/o emocionales: consumo de drogas y alcohol, conductas autolesivas, ideación suicida, disminución del rendimiento escolar/laboral, desórdenes alimentarios, fobias, agresividad, trastornos de adaptación, ansiedad, trastornos del sueño, depresión, baja autoestima, sentimientos de estigmatización y culpabilidad, trastornos de identidad sexual, conocimiento sexual precoz o inapropiado, exhibicionismo y trastornos de adaptación social, entre otros. Se debe prestar particular atención en un embarazo con las siguientes características: gestante menor de 15 años, rechazo del embarazo, consulta tardía, ocultamiento, ambigüedad y contradicciones acerca de la identidad del cogestante, rechazo del bebé o graves dificultades para establecer el vínculo e insistente pedido para dar al bebé en adopción.

Otra problemática que se evidenció en este trabajo fue la falta de presentación de la LS o carnet unificado de vacunación al momento de la CB en la gran mayoría de los casos. Debido a ello, fue imposible constatar si la vacunación estaba completa o incompleta para indicar en forma correcta las inmunizaciones. Es necesario capacitar a la población para que concurra a toda consulta médica con dicha documentación.

Con respecto a las ITS que ocurren a consecuencia de los DAS, no existe en Argentina prácticamente ninguna clase de registro oficial, siendo su prevalencia totalmente desconocida. La tasa de sífilis en la población de 10 a 14 años alerta en parte sobre situaciones de AS infanto-juvenil y se muestra como un problema que debe ser abordado integralmente, con enfoque de derechos, género y diversidad y en forma transversal entre los ministerios de Salud, Educación, Justicia y de las Mujeres, Géneros y Diversidad. Existe una íntima relación entre la ocurrencia de AS y la presencia de una o más ITS; por ello se recomienda pesquisar siempre la presencia de ITS en todas las víctimas de

DAS. De igual forma, se recomienda considerar la posibilidad de un AS ante el hallazgo de una ITS en un/a menor; solo así se podrá cumplir con el objetivo de prevenir la ocurrencia de daños irreversibles a la salud o minimizar sus posibles secuelas.

Las ITS que se suelen incluir en el cribado y profilaxis en los protocolos de atención en el contexto de un DAS son: sífilis, gonorrea, uretritis no gonocócica, vaginosis, linfogranuloma venéreo, chancro blando, granuloma inguinal, herpes genital, verrugas genitales por virus del papiloma humano (VPH), infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B y C, pediculosis pubis y escabiosis. (**Tabla 1**). Anteriormente se realizó un estudio en el que se incluyeron 412 víctimas de DAS, de las cuales 35 (8,5%) adquirieron una ITS. Estudios realizados sobre violencia doméstica reportan una

Infección de transmisión sexual	Agente causal
Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>
Gonorrea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Uretritis no gonocócica	(<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>)
Vaginosis	<i>Gardnerella</i> sp, <i>Trichomonas</i> sp.
Linfogranuloma venéreo	<i>Clamidia trachomatis</i> serotipos L1, L2 y L3
Chancro blando	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Granuloma inguinal	<i>Klebsiella granulomatis</i>
Herpes genital	Herpes simplex tipo 2
Verrugas genitales	Viurs del papiloma humano
Infección por VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Hepatitis B	Virus de la hepatitis B
Hepatitis C	Virus de la hepatitis C
Pediculosis pubis	<i>Pthirus pubis</i>
Escabiosis	<i>Sarcoptes scabiei</i>

Tabla 1. Principales infecciones de transmisión sexual y sus agentes causales.

asociación positiva entre ITS y violencia intrafamiliar, lo cual pudiera relacionarse con las altas tasas de sexo forzado en mujeres, las reducidas posibilidades que tienen estas de negociar la práctica del sexo protegido y uso del condón, así como el poco acceso a consejería y pruebas diagnósticas para ITS.

Resulta importante poder distinguir entre las ITS diagnosticadas en la primera consulta y aquellas encontradas durante el seguimiento. En nuestro estudio, la prevalencia de ITS fue del 3,3% y la de GND del 0,3%. Si bien no se detectaron ITS ni GND en la CB, solo el 61% de los pacientes concurren a realizarse los controles médicos de seguimiento; en ellos se diagnosticaron producto del AS, 1 caso de sífilis en una mujer adulta, 3 casos de sífilis en niños y en 1 niña además una GND. Al realizarse la correspondiente investigación de estos casos, se reveló que todos ellos habían radicado la denuncia policial correspondiente en tiempo y forma y habían sido atendidos en el Cuerpo Médico Forense, pero ninguno de ellos había recibido la QP para ITS y AHE y tampoco habían sido derivados a alguna institución de salud para poder recibirla. La misma situación se constató en las consultas médicas realizadas tardíamente, luego de las 72 hs de ocurrido el DAS. Esta situación motivó que se procediera inmediatamente a la capacitación de los equipos intervinientes y el establecimiento de un algoritmo de derivación a la institución de salud.

El tratamiento de las víctimas de DAS debe seguir los siguientes pasos:

- Tratamiento de las lesiones corporales y genitales.
- Anticoncepción hormonal de emergencia (AEH): su eficacia depende del momento de la toma. Su ingesta antes de las 12 horas posteriores a la relación de riesgo tiene un 95% de eficacia y luego descende, aunque se puede usar hasta cinco días posteriores a la relación sexual no consentida. Es clave que la AEH se administre inmediatamente cuando sea demandada; no es necesario el consentimiento de madres, padres, tutoras/es, ni la realización de ningún estudio.

- Profilaxis de ITS: se utilizan distintos esquemas antibióticos. En cuanto a la profilaxis posexposición (PPE) sexual para VIH, se recomienda el inicio dentro de las 2 horas y hasta un máximo de 72 horas luego de la exposición sexual. Si se superó ese lapso temporal, se realizará únicamente el monitoreo de síntomas y signos de infección aguda. Para la PPE sexual para VIH podrán seleccionarse distintos esquemas de terapia antiretroviral.
- Chequeo del estado de inmunizaciones: si corresponde, completar calendario según edad.
- Seguimiento médico (Tabla 2)

	Basal	2 semanas	6 semanas	12 semanas
Evaluación clínica				
Función renal y hepática				----
HGCs β				----
ELISA VIH		----		
VDRL		----		
Anticuerpos treponémicos		----		
HBs Ag		----		
HBcAc		----		
HCV Ac		----		

HGCs β : hormona gonadotrofina coriónica subunidad β ; ELISA VIH: Enzima inmunoensayo para VIH; HBsAg: antígeno de superficie para hepatitis B; HBcAc: anticore hepatitis B; HCV: anticuerpos para hepatitis C.

Tabla 2. Seguimiento clínico y exámenes de laboratorio que deben realizarse posteriormente a la ocurrencia de un abuso sexual.

Conclusiones

En nuestra casuística las víctimas de DAS fueron principalmente mujeres y niñas de 11 a 14 años, objeto de únicos o múltiples episodios. En la mayoría de los casos, el agresor pertenecía al entorno familiar de la víctima y el AS ocurrió en el propio hogar.

La consulta médica fue realizada tardíamente, por lo que en muchos casos no estuvo indicada la QP. Sin embargo, un elevado número de víctimas que sí tenía la indicación, no la recibió, en ellos se diagnosticaron 4 casos de sífilis y una GND. Sólo un poco más de la mitad de los pacientes atendidos concurren a realizarse los controles médicos correspondientes.

Los DAS son un grave problema global, con severas implicancias sobre la salud, que abarca aspectos médicos, legales y psicológicos, por lo que la asistencia ha de ser rápida, efectiva y transdisciplinaria, estableciendo protocolos de atención para poder dar la cobertura adecuada a las víctimas.

Es indispensable coordinar el abordaje de las víctimas de DAS con el cuerpo de medicina forense, para la pronta y adecuada derivación al hospital. Por ello, es imprescindible la realización de capacitación del protocolo de atención de los casos de DAS, no sólo al equipo de salud, sino también al personal policial y cuerpo médico forense.

Con respecto a las ITS consecuencia de los DAS, no existe en Argentina prácticamente ninguna clase de registro oficial, siendo su prevalencia totalmente desconocida; existen muy escasos estudios que traten acerca del impacto y repercusiones del AS en menores. Es necesaria la realización de estudios longitudinales y/o experimentales para tener el debido conocimiento al respecto.

Referencias bibliográficas

- Bernstein, J. C.; González, M.; Knauer, T.; Rosales, M.; Ludueña, M. (2022). Infecciones de transmisión sexual en contexto de delitos de agresión y violencia sexual. En *XXII Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología* (Trabajo N° 0017). Buenos Aires, Argentina.
- Buder, S.; Schöfe, H.; Meyer, T.; Bremer, V.; Kohl, P. K.; Skaletz-Rorowski, A.; *et al.* (2019). Infecciones bacterianas de transmisión sexual. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 17(3), 287-315.
- Chejter, S. (2018). *Abusos sexuales y embarazo forzado en la niñez y adolescencia Lineamientos para su abordaje interinstitucional* (1° ed). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Secretaría Nacional de Niñez, Adolescencia y Familia. Plan Nacional de Prevención del Embarazo no Intencional en la Adolescencia. ISBN 978-987-27770-9-8.
- Chejter, S. (2021). *Protocolo para la atención integral de personas víctimas de violaciones sexuales: actualización 2021* (4° ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Dirección Nacional de Salud Sexual y Reproductiva, 2021. ISBN 978-950-38-0292-2.
- Dirección Nacional de Salud Sexual y Reproductiva. Ministerio de Salud de la Nación. (2021). *Protocolo para la atención integral de personas víctimas de violaciones sexuales*. (4° edición).
- Giberti, E.; Monath, E. (2019). *Un Análisis de los Datos del Programa "Las Víctimas Contra Las Violencias" 2018-2019*. N° 7: Serie violencia contra niñas, niños y adolescentes. UNICEF Argentina.
- Hernández Ragpa, L.; Valladolid Urdangaray, A.; Ferrero Benítez O, L.; Díez Sáez, C. (2019). Infecciones de transmisión sexual en el contexto de una agresión sexual. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(3), 187-194.

- Murillo, J. A.; Mendiburo-Seguel, A.; Santelices, M. P.; Araya, P.; Narváez, S.; Piraino, C.; *et al.* (2021). AS temprano y su relación en el bienestar actual del adulto. *Psicoperspectivas*, 20(1). Recuperado de <https://dx.doi.org/10.5027/>
- Oliveira Viana, V. A.; Pereira Madeiro, A. P.; Medeiros Mascarenhas, M. D.; Pacheco Rodrigues, M. T. (2022). Temporal trend of sexual violence against adolescent women in Brazil, 2011- 2018. *Ciencia e Saude Coletiva*, 27(6), 2363-2371.
- Palacios, J. R. (2008). “El AS a niñas, niños y adolescentes: un secreto familiar, un problema social”. *Revista Educare*, 12, 99-111.
- Peláez Mendoza, J. (2010). El AS y su asociación con las infecciones de transmisión sexual. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 36(1), 109-123. [psicoperspectivas-vol20-issue1-fulltext-2043](#)
- Torazzi, E.; Merelli, V.; Barbara, G.; Kustermann, A.; Marasciuolo, L.; Collini, F.; Cattaneo, C. (2021). Similarity and differences in sexual violence against adolescents and adult women: the need to focus on adolescent victims. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 34(2), 302-310.
- UNICEF Argentina. (noviembre 2019). *Serie N° 7. Violencia contra niñas, niños y adolescentes. Un análisis de los datos del programa “Las Víctimas Contra las Violencias” 2018-2019.*
- Unidad Fiscal Especializada en Violencia contra las Mujeres. (2019). *Relevamiento de fuentes secundarias de datos sobre violencia sexual a nivel país y en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Informe del Ministerio Público Fiscal de la Procuración General de la Nación.* República Argentina.

DINÁMICA DEMOGRÁFICA DE LAS POBLACIONES HUMANAS DEL NOROESTE DE PATAGONIA Y CENTRO DE CHILE DURANTE EL HOLOCENO INFERIDA A PARTIR DE DOS LÍNEAS DE EVIDENCIA INDEPENDIENTES

Cobos, Virginia Agustina¹

Introducción

El estudio de la dinámica demográfica de las poblaciones prehistóricas requiere de la integración de datos procedentes de múltiples líneas de evidencia independientes que permitan la recuperación de información confiable sobre los patrones de cambio en el tamaño y la densidad poblacional a través del tiempo. Esto se debe a que entre una población viva y el registro arqueológico media una multiplicidad de factores de diversa naturaleza –intrínsecos (e.g., patrones de mortalidad, fecundidad y morbilidad) y extrínsecos (e.g., procesos postdeposiciones) – que pueden interferir en las interpretaciones demográficas de las poblaciones del pasado. En este contexto, la exploración de la dinámica demográfica de poblaciones pasadas basada en líneas de evidencia independientes puede contribuir a evaluar la existencia de posibles factores generadores de sesgos y evaluar la robustez de las inferencias realizadas (Cobos *et al.*, 2024).

¹ Licenciada en Antropología y Doctora en Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Ayudante Diplomada de la Cátedra de Antropología Biológica IV en la UNLP. Docente Investigadora de la UNLP y becaria posdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Las poblaciones humanas que habitaron el noroeste de Patagonia (NOPat) y el centro de Chile (cCh) desde fines del Pleistoceno hasta el contacto Hispano-Indígena –500 años AP– han sido caracterizadas como grupos pequeños de cazadores-recolectores (Borrero, 1994-1995; Campbell y Quiroz, 2015; entre otros). Ocuparon heterogéneamente ambientes diversos, probablemente desarrollando dinámicas demográficas disímiles. La historia demográfica de estas poblaciones constituye un caso de estudio interesante dado que fue una de las últimas regiones del mundo en ser poblada por humanos y a que trabajos anteriores arrojaron resultados dispares. El NOPat, particularmente el norte de Neuquén (NNqn), ha emergido en años recientes como un área de especial interés para estudios paleodemográficos debido a que datos ambientales y culturales sugieren fluctuaciones en la dinámica poblacional, e indicadores culturales de incremento de complejidad social, posiblemente vinculados a un crecimiento demográfico, se dataron tempranamente en relación con otras áreas de Patagonia (Bernal *et al.*, 2017; Cobos, 2022; Perez *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta el presente no se han realizado estudios orientados a evaluar sistemáticamente la historia demográfica de las poblaciones del área. En particular, la mayor parte de los estudios se limitaron a caracterizar el tamaño poblacional con un abordaje tangencial y cualitativo, empleando evidencia arqueológica fragmentaria. Esta descripción, basada principalmente en distribuciones espacio-temporales de sitios arqueológicos y artefactos, resulta imprecisa y parcial, limitando la posibilidad de comprender la historia de las poblaciones pasadas de esta región. En la última década, impulsados por el incremento de fechados absolutos y la incorporación de estudios moleculares, surgieron los primeros trabajos, abordando la demografía de las poblaciones prehistóricas como objetivo principal y permitiendo visibilizar fluctuaciones poblacionales en Patagonia.

El recorte espacial de este estudio se fundamenta en criterios de biología molecular, arqueológicos y ambientales. La evidencia disponible indica que las poblaciones humanas que habitaron el NOPat y cCh tuvieron una dinámica biológica y cultural conjunta en épocas

prehistóricas, facilitada por la articulación de redes transcordilleranas de comunicación y aprovisionamiento. De este modo, estas sociedades móviles establecieron desde épocas tempranas un intenso flujo regional genético y de objetos materiales y simbólicos, en el contexto de un ambiente muy variable.

Demografía y poblaciones humanas

Modelos demográficos

Dentro de los modelos teóricos de crecimiento poblacional, el exponencial y el logístico constituyen aproximaciones clásicas relativamente simples que brindan estimaciones en función de parámetros determinados *a priori* (Roughgarden, 1979). Alternativamente, se ha postulado la importancia de generar modelos empíricos *a posteriori* para representar patrones más complejos, que permitan evaluar hipótesis alternativas. En efecto, en la dinámica de las poblaciones pueden ocurrir cambios demográficos abruptos resultado de, por ejemplo, cambios climáticos, intensificación en el uso de recursos, migraciones, enfrentamientos intergrupales o enfermedades. Tales modelos flexibles permiten describir detalladamente eventos demográficos específicos, logrando mejores ajustes a los datos. Entre éstos, los modelos continuos lineales por tramos (CPL) permiten describir la distribución de densidad poblacional a partir de un número pequeño de fases lineales articuladas por puntos de inflexión de la curva modelada donde cambia la tasa de crecimiento poblacional (Timpson *et al.*, 2021).

Indicadores paleodemográficos

Los indicadores arqueológicos fueron los primeros en utilizarse en los estudios que abordaron la demografía de poblaciones patagónicas. Todos ellos miden la intensidad de la señal arqueológica y sus fluctuaciones, relacionándola con cambios proporcionales en el tamaño y distribución poblacional a lo largo del tiempo. Entre ellos, fueron muy utilizadas las distribuciones temporales de frecuencias de fecha-

dos absolutos. Su empleo se basa en la suposición de que, a mayor número de individuos, más fuerte será la señal arqueológica resultante.

Entre los indicadores biológicos, los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados para realizar estimaciones confiables. El ADN mitocondrial (ADNmt) es una valiosa herramienta que contiene información histórico-genealógica que permite aplicar estimaciones de reloj molecular. La teoría de coalescencia relaciona la forma de los árboles genealógicos moleculares y el número de linajes con las trayectorias paleodemográficas. De este modo, a partir del análisis de las secuencias procedentes de individuos de poblaciones actuales, conociendo la tasa de mutación, se puede inferir la dinámica demográfica de esas poblaciones en el pasado. Debido a que se transmite por vía materna, permite estimar exclusivamente las genealogías y trayectorias femeninas.

En el poblamiento de Sudamérica llegaron individuos cuyas variantes mitocondriales se distribuyen en cuatro linajes principales o haplogrupos, denominados A, B, C y D. En el NOPat y cCh se encuentran con mayor frecuencia el C y el D, divididos en varios sublinajes presentes en diferentes proporciones en la región. Con la llegada de mujeres europeas, se introdujeron a la población local nuevas variantes (Bodner *et al.*, 2012; de Saint Pierre *et al.*, 2012).

Objetivo

El objetivo del trabajo presentado en este Seminario es explorar la dinámica demográfica de las poblaciones humanas en diferentes escalas espaciales del NOPat y el cCh entre los 15500-500 años AP, mediante el empleo de dos indicadores paleodemográficos independientes: genealogías estimadas a partir de ADNmt moderno y distribución espacio-temporal de fechados absolutos. Asimismo, discutir las posibles causas de las diferencias entre las inferencias paleodemográficas obtenidas mediante ambos métodos, sus limitaciones y fortalezas, para unidades espaciales de diferente extensión: regional (el NOPat más el cCh), subregional (NOPat y el cCh por separado) y local (NNqn).

Hipótesis

En primer lugar, se espera que las reconstrucciones demográficas basadas en datos moleculares sean más sensibles que las basadas en fechados absolutos, particularmente para las fluctuaciones poblacionales asociadas al poblamiento inicial de la región (Cobos, 2022; Perez *et al.*, 2016). En segundo lugar, dado que la evidencia arqueológica, biológica y etnohistórica sugiere que los grupos humanos de la región tuvieron tamaños variables con poblaciones agricultoras en el cCh de mayor tamaño que los pequeños grupos de cazadores-recolectores en el NNqn (Cobos, 2022), se esperan dinámicas demográficas diferentes en las tres escalas espaciales analizadas. Sin embargo, con base en estudios previos, se espera encontrar algunos patrones comunes: un primer y ligero aumento demográfico asociado al poblamiento inicial, un segundo incremento durante el Holoceno Medio vinculado a la intensificación y diversificación de los recursos explotados, y un tercer y último crecimiento poblacional durante el Holoceno Tardío relacionado con el surgimiento de la alfarería y la incorporación de plantas domesticadas a la dieta (Campbell y Quiroz, 2015; Cobos, 2022; Perez *et al.*, 2016).

Materiales y Métodos

Estimaciones demográficas empleando genealogías moleculares

La caracterización del patrón de cambio poblacional será explorada en primer lugar mediante el empleo de genealogías moleculares estimadas a partir de ADNmt moderno. El método no paramétrico de *Bayesian Skyline Plots* (BSP) permite inferir las dinámicas demográficas pasadas a partir de secuencias moleculares procedentes de los descendientes actuales de esas poblaciones.

Se realizó el muestreo de individuos residentes en distintas localidades de la provincia del Neuquén, con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Italiano de Buenos Aires (03/12/09), obteniéndose 38 secuencias mitocondriales. En todas se amplificó la Región Hiper-

variable I (HVR I) y en 21 de ellas también la II (HVR II). Asimismo, se recopilaron 252 secuencias mitocondriales amerindias del NOPat y el cCh procedentes de publicaciones anteriores (Figura 1; de Saint Pierre *et al.*, 2012; Moraga *et al.*, 2000; Motti, 2012; Postillone *et al.*, 2019). Por lo tanto, en total se obtuvo un total de 290 secuencias para realizar las estimaciones demográficas.

Las muestras fueron recolectadas en tres localidades de la provincia del Neuquén, priorizando individuos nacidos localmente: Rincón de Los Sauces y Buta Ranquil en el Departamento Pehuenches, y Aluminé en el Departamento de Aluminé (Figura 1). Junto con la toma

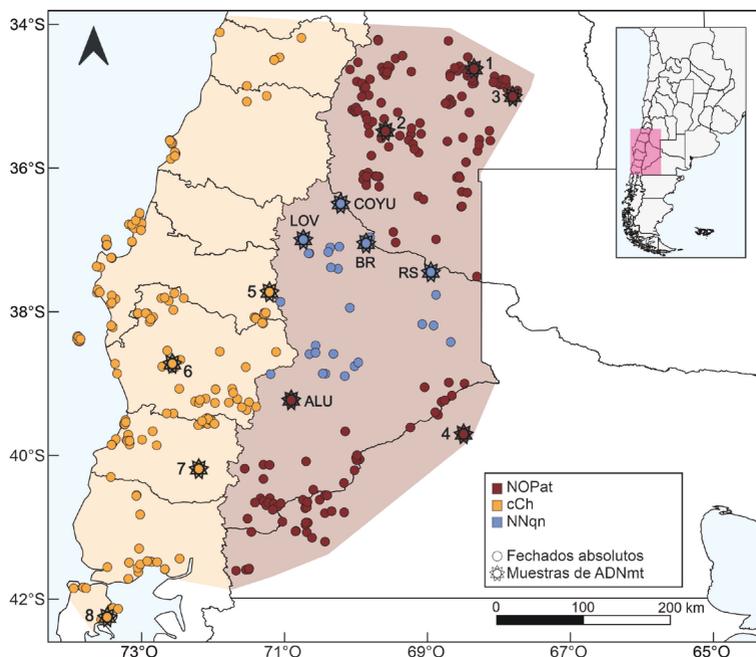


Figura 1. Escalas geográficas estudiadas en este trabajo, distribución espacial de los sitios arqueológicos y localidades de procedencia de las muestras de ADNmt.

1, 2 y 3: Motti (2012); 4, 6 y 8: de Saint Pierre y otros (2012); 5 y 7: Moraga y otros (2000); COYU (Coyuco-Cochico), LOV (Las Ovejas), BR (Buta Ranquil), RS (Rincón de los Sauces), y ALU (Aluminé): Postillone y otros (2019) y Cobos (2022).

Figura tomada y modificada de Cobos y otros (2024).

de la muestra y la aprobación del consentimiento informado de cada participante, se realizó una encuesta para rastrear el origen geográfico más remoto del linaje materno de los voluntarios para utilizar como criterio de agrupación geográfica. De este modo, las muestras se agruparon en cuatro grupos geográficos: regional, NOPat (excluyendo al NNqn, N=96), cCh (N=139), y NNqn (N=55).

Para realizar las reconstrucciones paleodemográficas de los últimos 15500 años, se estimaron curvas BSP (Ho y Shapiro, 2011) empleando todas las secuencias (N=290). Con la finalidad de disminuir el posible efecto del flujo génico reciente sobre el acervo genético regional, estas curvas también se estimaron a partir de las 220 secuencias correspondientes a los haplotipos más frecuentes o específicos para la región: C1b, D1g y B2i y sus derivados (Bodner *et al.*, 2012; de Saint Pierre *et al.*, 2012). Las curvas se simularon en el programa BEAST v1.6.1 (Suchard *et al.*, 2018) con un intervalo generacional femenino de 25 años. Se consideraron 50.000.000 generaciones para la longitud total de la cadena de Markov Monte Carlo y una frecuencia de muestreo cada 5.000 generaciones. Se utilizó un modelo HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) para la sustitución de nucleótidos con una tasa de $3,02 \times 10^{-7}$ sustituciones por sitio/año (Endicott y Ho, 2008). Estos parámetros se establecieron utilizando el programa BEAUTi v1.6.1 (Suchard *et al.*, 2018). Por último, los BSP se generaron utilizando el programa Tracer v1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018).

Finalmente, se calculó una red molecular a partir de aquellas secuencias con los fragmentos HVR I y II, para probar la ausencia de estructuración poblacional y analizar las relaciones filogenéticas de las secuencias de las diferentes áreas geográficas. Las secuencias fueron formateadas en el programa DnaSP v6.12.03 (Rozas, 2009), eliminándose los sitios faltantes e invariables; a cada sitio polimórfico se le asignó su posición real en la secuencia y un peso relativo (Soares *et al.*, 2009) utilizando el programa Network v10.2.0.0². Finalmente, se

² Para más información, acceder a: www.fluxus-engineering.com/netwinfo.htm

trazaron las redes en el mismo programa, empleando el método MJ ($\epsilon=0$; Bandelt *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 1992).

Estimaciones demográficas empleando fechados absolutos

Para explorar los cambios temporales en la densidad de población humana en toda la región, se empleó un conjunto de 1.073 fechados absolutos georreferenciados procedentes de 371 sitios arqueológicos, obtenidos mediante radiocarbono, termoluminiscencia e hidratación de obsidiana, medidos sobre restos de carbones, huesos y dientes de humanos y de fauna, vegetales, cáscaras de huevo, conchas terrestres, materiales marinos (conchas marinas y algas), sedimentos, estiércol, cerámica y herramientas de obsidiana para el intervalo temporal de 15500-500 años AP. Los fechados fueron agrupados en dos escalas subregionales: NOPat (N=554, desde los 34°S en la provincia de Mendoza, la provincia del Neuquén y el oeste de Río Negro), y cCh (N=519, regiones de Libertador Bernardo O'Higgins, Maule, Ñuble, Biobío, Araucanía, Los Lagos y norte de Los Ríos) (Figura 1). Por otra parte, se agruparon los fechados del NNqn en una escala local (N=109, delimitado por las cuencas de los ríos Barrancas y Colorado en el norte, y los paralelos 39° y 38,5° por el sudoeste y el sudeste, respectivamente).

A continuación, se calibraron los fechados radiocarbónicos basadas en materiales terrestres y marinos utilizando las curvas SHCal20 (N= 852; Hogg *et al.*, 2020) y Marine20 (N= 53; Heaton *et al.*, 2020), respectivamente. Los fechados realizados mediante termoluminiscencia (N=167) e hidratación de obsidiana (N=1) no fueron calibrados.

A partir de todos los fechados absolutos, se estimaron curvas de Distribución de Probabilidad Sumada (SPD; Crema *et al.*, 2016), agrupándolos cada 200 años con la finalidad de reducir las posibilidades de sobrerrepresentar una misma fase para un sitio (Crema y Bevan, 2021). Posteriormente, se realizó la construcción de los modelos CPL y la selección de aquellos con el número de fases que mejor se ajustara

a las curvas SPD estimadas. Para capturar la incertidumbre derivada del error de muestreo y mostrar las curvas SPD con intervalos de confianza (IC) lo suficientemente amplios (95%) para asegurar una interpretación robusta de los resultados, en la estimación de los modelos también se agruparon los fechados cada 200 años. Para encontrar el modelo con un mejor ajuste se empleó el criterio de información bayesiano (BIC; Timpson y otros, 2021). Luego, se realizó una prueba de simulación SPD con 20.000 permutaciones generando conjuntos de datos simulados bajo el modelo especificado y se calculó un valor p comparándolos con el conjunto de datos observado. Todos estos análisis se realizaron utilizando los paquetes rcarbon v1.4.2 (Crema y Bevan, 2021), ADMUR v1.0.3 y DEoptimR v1.0-8 (Timpson *et al.*, 2021) del programa R v 4.0.3 (R-Development Core Team, 2020).

Resultados

Análisis a partir de genealogías moleculares

En la Figura 2.a se muestran las curvas BSP regional, del NOPat, cCh y NNqn estimadas a partir de las 290 secuencias mitocondriales. A nivel regional se observa que, partiendo de un tamaño poblacional efectivo femenino de ~ 1.400 individuos, la población comienza a incrementarse lentamente a partir de los 16000 años AP, alcanzando ~ 4.000 individuos para los 10000 años AP. En esta fecha, la curva muestra una marcada aceleración hasta los 6000 AP. Luego continúa incrementándose lentamente hasta los 500 años AP, llegando a unos ~ 40.000 individuos. El NOPat presenta un patrón similar, aunque con valores demográficos superiores hasta los 3500 años AP. El NNqn mantiene valores muy semejantes a los regionales durante el Holoceno Temprano y Medio. A lo largo del Holoceno Temprano y Medio, estas tres curvas tuvieron una trayectoria muy similar, mostrando un marcado aumento entre los 10000-5000 años AP. La curva estimada para el cCh exhibe los niveles poblacionales más bajos a lo largo de toda su trayectoria, sin cambios hasta los 9000 años AP, cuando muestra una aceleración más sutil que

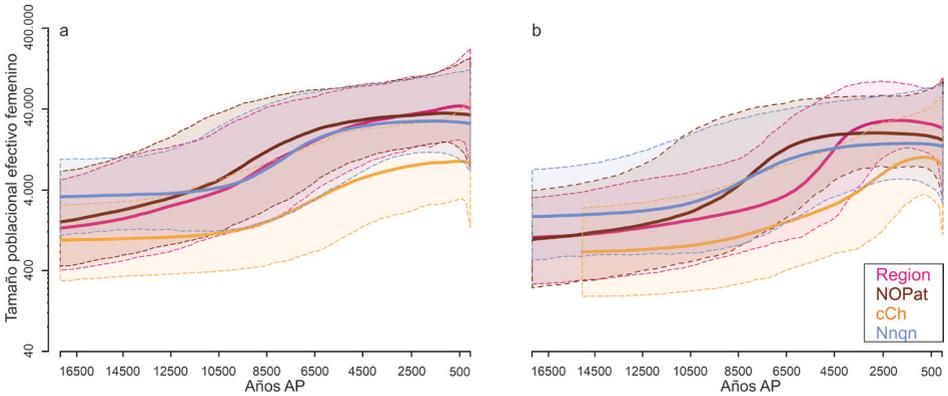


Figura 2. Trayectorias demográficas inferidas a partir de los datos moleculares para la región, las dos subregiones (NOPat y cCh) y el área local del NNqn. (a) curvas BSP estimadas a partir de las 290 secuencias; (b) curvas BSP estimadas a partir de las 220 secuencias de haplotipos específicas para la región. Figura tomada y modificada de Cobos y otros (2024).

la del resto de BSP. En la Figura 2.b, se presentan las curvas estimadas a partir de las 220 secuencias correspondientes a haplotipos específicos para la región. Todas ellas mostraron valores demográficos más bajos que las curvas descritas previamente.

En la red molecular se observa que las muestras correspondientes al haplotipo C1b13 conforman el nodo más grande compuesto principalmente por muestras chilenas (Figura 4). El mayor número de conexiones de este nodo es con haplotipos derivados de diversas procedencias, diferenciados por un bajo número de mutaciones, mostrando un patrón estrellado característico de un haplotipo en expansión. Le siguen en tamaño los nodos del haplotipo D1g, que también incluyen muestras principalmente del cCh, lo que sugiere su mayor antigüedad frente a otras variantes. La mayoría de las secuencias del NNqn no están agrupadas en grandes nodos, lo que sugiere que el patrón de expansión poblacional observado en las curvas BSP estimadas para esta escala estaría reflejando un aumento ocurrido en el cCh (Figura 2).

Análisis a partir de fechados absolutos

En los resultados del análisis de selección de modelos CPL se observa que, al aumentar la escala espacial, aumenta la complejidad del modelo mejor ajustado a los datos (Figura 3). El SPD regional del modelo que mejor se ajusta a los datos –CPL de 4 fases lineales articuladas por 3 inflexiones– muestra una baja densidad de fechados entre los 15500-10000 años AP. Posteriormente, se observa un ligero aumento en la pendiente de la curva alrededor de los 9000 años AP, seguido de otro hacia los 7500 años AP. Con posterioridad a estos eventos, la curva cambia a un ritmo lento hasta un último y pronunciado incremento en la densidad de fechados para los 2500 años AP.

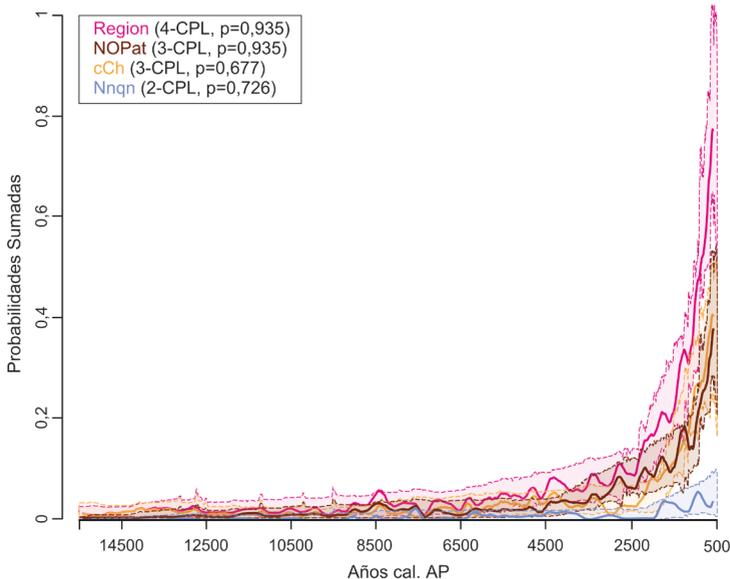


Figura 3. Curvas SPD de los mejores modelos CPL para la región, las dos subregiones (NOPat y cCh) y el área local del NNqn. Las curvas SPD se escalaron multiplicando el número de muestras utilizadas en cada sector para las simulaciones. Figura tomada y modificada de Cobos y otros (2024).

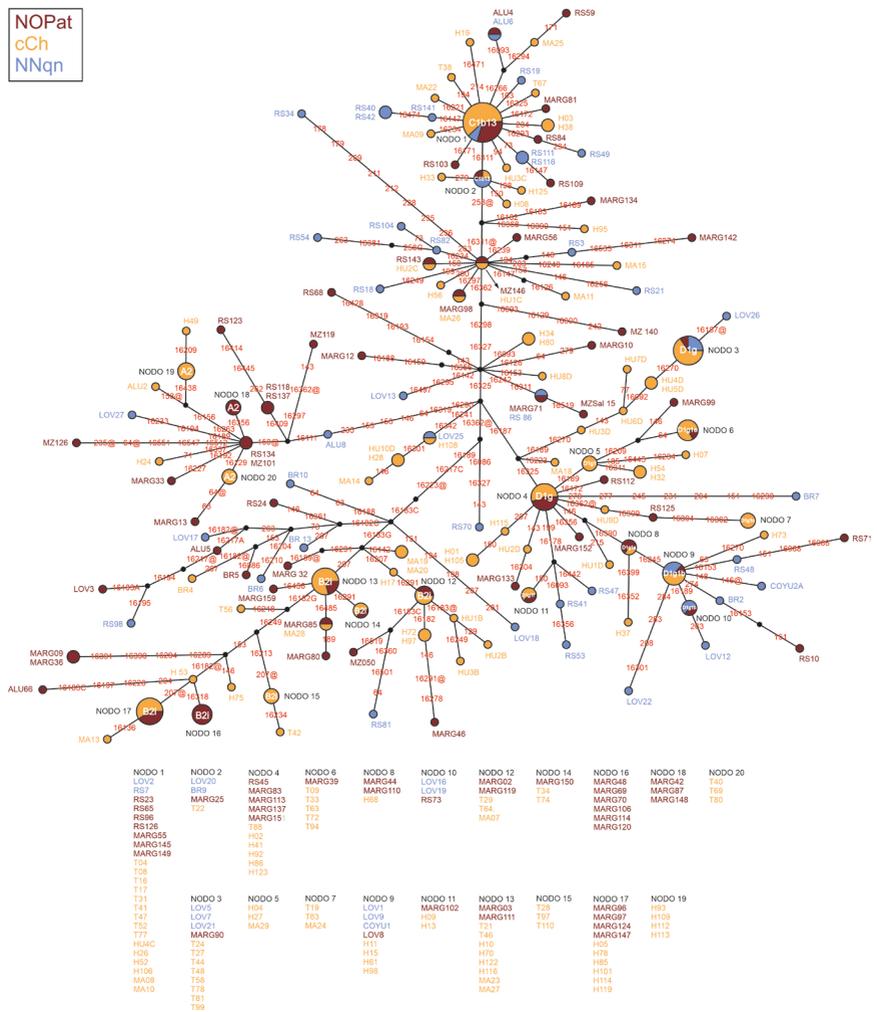


Figura 4. Red molecular construida con todas las secuencias con los fragmentos HVR I y II. Figura tomada y modificada de Cobos y otros (2024).

Los modelos que mejor se ajustan a los conjuntos de datos del NO-Pat y el cCh corresponden a CPL de 3 fases. Las curvas estimadas para ambas subregiones en forma independiente, muestran trayectorias que se aproximan a la tendencia regional (Figura 3). Sin embargo, la curva del cCh presenta valores superiores a la del NOPat para el Pleistoceno tardío. Esta relación se revierte durante la primera mitad del Holoceno Tardío. Finalmente, la curva calculada para la escala local de NNqn –CPL de 2 fases– presenta una baja densidad de fechados hasta los 6000 años AP, cuando comienza a aumentar suave y progresivamente su pendiente hasta los 4500 años AP. Posteriormente, se observa un nuevo incremento, menos marcado que el observado a escalas espaciales mayores, hacia los 2000 años AP.

Discusión y conclusiones

En este trabajo se realizó la primera evaluación sistemática de la confiabilidad en las estimaciones demográficas basadas en dos indicadores paleodemográficos independientes.

Siguiendo las expectativas postuladas, las curvas estimadas para las diferentes escalas espaciales mostraron una baja densidad poblacional en la transición Pleistoceno-Holoceno, lo que podría esperarse para el poblamiento inicial de la región. No obstante, a lo largo del Holoceno la dinámica demográfica inferida a partir de ambos indicadores mostró discrepancias. Mientras que las curvas derivadas del ADNmt mostraron un incremento en la transición Holoceno Temprano-Medio, aquellas obtenidas a partir de los fechados absolutos sólo mostraron un aumento conspicuo hacia el Holoceno Tardío (Figura 5). El comportamiento de la curva BSP no permite descartar la hipótesis de un segundo incremento demográfico para el Holoceno Medio, lo que podría estar asociado a la intensificación y diversificación en la explotación de recursos. En esta dirección, trabajos previos para la región basados en datos moleculares han sugerido una gran diversificación de los haplogrupos específicos para los 5000-3500 años AP, que fue interpretado como manifestación de un aumento

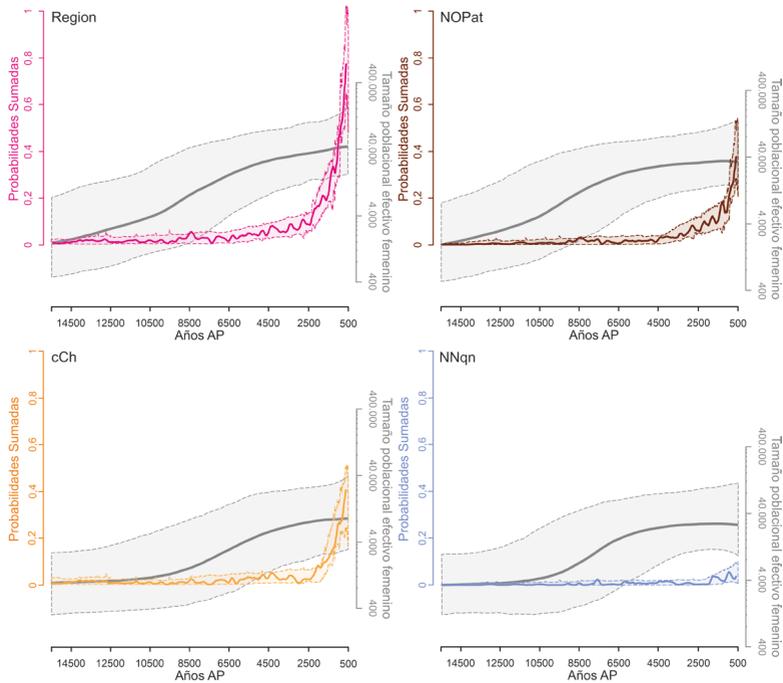


Figura 5. Comparación del grado de solapamiento entre los IC obtenidos en las estimaciones demográficas obtenidas a partir de ambos indicadores demográficos para cada escala espacial analizada entre los 15000-500 años AP. Figura tomada y modificada de Cobos y otros (2024).

demográfico durante el Holoceno Medio (Bodner *et al.*, 2012; de Saint Pierre *et al.*, 2012). El pronunciado incremento observado en las curvas SPD para el Holoceno Tardío insta a reconocer el impacto de la aparición de la cerámica y las plantas domesticadas en las estrategias de subsistencia de los cazadores-recolectores de la región. No obstante, este patrón no es claro para el NNqn, donde también se observaron las mayores diferencias en las trayectorias estimadas a partir de ambos indicadores durante el Holoceno Tardío (Figura 5). Por otro lado, estudios previos para la región basados en dataciones radiocarbónicas

reportaron aumentos demográficos para el Holoceno Medio y Tardío (Llano *et al.*, 2020; Perez *et al.*, 2016 y 2017; entre otros). Sin embargo, para Neuquén mostraron una relativa estabilidad demográfica durante la transición Pleistoceno-Holoceno, pero un crecimiento continuo durante el Holoceno Medio (Perez *et al.*, 2016). Cabe destacar que tales observaciones contrastantes entre diferentes áreas de la región son esperables dadas las características ambientales, biológicas y culturales heterogéneas.

Las diferencias entre las estimaciones obtenidas a partir de ambos indicadores podrían estar relacionadas con que aquellas inferidas a partir del ADNmt sólo reflejan el tamaño poblacional femenino que aporta descendencia a la siguiente generación, por lo que constituye una estimación parcial del tamaño poblacional total (Ho y Shapiro, 2011). Asimismo, no debe subestimarse el carácter indirecto de los fechados absolutos como indicador paleodemográfico. Por otro lado, las diferencias observadas también podrían deberse al grado de información preservada por los fragmentos del ADNmt empleados para las estimaciones genealógicas (Postillone *et al.*, 2019). Por tal motivo, este indicador es particularmente informativo para procesos demográficos antiguos, siendo menos fiable para los más recientes como consecuencia de la probable reducción de la diversidad de linajes tras la llegada de los europeos (Pérez *et al.*, 2017). Estimaciones más robustas podrían obtenerse incluyendo en los análisis múltiples regiones del genoma nuclear y/o incorporando muestras de ADN arqueológicas, aumentando la probabilidad de estudiar la variación de linajes extintos (Heled y Drummond, 2008). Por otro lado, la densidad demográfica relativamente mayor obtenida en las curvas SPD para el Holoceno Tardío en comparación con períodos tempranos podría ser resultado de la preservación diferencial del registro arqueológico (Surovell *et al.*, 2009). No obstante, en este trabajo se abordó la pérdida tafonómica y el error de muestreo realizando múltiples controles metodológicos que permiten confiar en la robustez de las reconstrucciones demográficas estimadas.

En las estimaciones obtenidas para todas las escalas espaciales a partir del ADNmt, los cambios demográficos más notables ocurrieron más tempranamente que en los modelos construidos a partir de los fechados absolutos. La curva BSP del NNqn exhibió un patrón similar al regional, aunque con valores de población femenina más altos en el Pleistoceno tardío, y valores similares durante el Holoceno Medio, lo que indica un aumento demográfico acelerado durante este período; en ambas curvas no se observó crecimiento demográfico durante el Holoceno Tardío. Cabe destacar que se obtuvieron resultados similares cuando se repitió la curva utilizando secuencias de haplotipos específicos para la región. Por otro lado, se detectó que las curvas para la escala regional, el NNqn y el NOPat, fueron más similares entre sí que con la curva del cCh. Sin embargo, los IC de todos los BSP estimados se superpusieron, lo que indicaría la existencia de diferencias menores entre las estimaciones en diferentes escalas espaciales. Por el contrario, la curva SPD del NNqn difirió de la tendencia presentada por el NOPat y la región en su conjunto a lo largo de toda su trayectoria. Estas diferencias se corresponden con la baja frecuencia de cerámica y restos de agricultura en el registro arqueológico del NNqn, probablemente debido al menor impacto de estas tecnologías en la subsistencia de esta zona (Cobos, 2022).

La red molecular evidenció la existencia de elevados niveles de flujo génico desde épocas tempranas entre las poblaciones de la región y, consecuentemente, una elevada diversidad de haplogrupos a escala local. Este factor podría explicar la similitud en el patrón de cambio demográfico observado en las estimaciones basadas en ADNmt para estas tres escalas espaciales. Por lo tanto, los datos moleculares empleados en este trabajo no proporcionan estimaciones robustas de cambios demográficos pasados para la escala local. Siguiendo este razonamiento, la curva BSP del NNqn podría considerarse un reflejo de la regional, inferida a partir de un submuestreo representativo de la diversidad mitocondrial presente en la región en su conjunto. Se concluye que las distribuciones temporales de frecuencias de fechados

absolutos presentan una menor sensibilidad que el ADNmt para realizar inferencias demográficas para períodos tempranos debido al efecto del sesgo tafonómico, pero son más robustos para reconstrucciones en escalas espaciales más pequeñas debido a los elevados niveles de flujo génico en la región. La incorporación de muestras de ADNmt antiguo y ADN nuclear en estimaciones demográficas es prometedora, ya que podría reducir el sesgo en el muestreo de la diversidad presente producto de la extinción de linajes locales luego de la llegada de los europeos al continente. Finalmente, la ampliación del número de fechados absolutos para región permitiría evaluar la robustez de los resultados obtenidos en este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Bandelt, H. J., Forster, P. y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Bernal, V.; Cobos, V. A.; Perez, S. I.; *et al.* (2017). “La estructura espacial del registro bioarqueológico de la provincia del Neuquén durante el Holoceno”. En Gordón F., Barberena R. y Bernal V. (Eds.). *El poblamiento humano del norte del Neuquén. Estado actual del conocimiento* (pp. 123-144). Buenos Aires; Aspha Ed.
- Bodner, M.; Perego, U. A.; Huber, G.; *et al.* (2012). Rapid coastal spread of first Americans: novel insights from South America’s Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome research*, 22(5), 811-820.
- Borrero, L. A. (1994-1995). Arqueología de la Patagonia. Palimpsesto. *Revista de Arqueología*, 4, 9-69.
- Campbell, R.; Quiroz, D. (2015). Chronological database for Southern Chile (35°30’-42° S), ~33000 BP to present: human implications and archaeological biases. *Quaternary International*, 356, 39-53.
- Cobos, V. A. (2022). *Modelado de la dinámica demográfica de las poblaciones humanas del norte de Neuquén (Patagonia, Argentina) durante el Holoceno* [Tesis Doctoral inédita]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

- Cobos, V. A.; Postillone, M. B.; Bernal, V.; *et al.* (2024). Inferring past demographic changes at different spatial scales in Northwest Patagonia and central-south Chile: Comparing absolute dates with molecular data. *Archaeometry*, 1-19.
- Crema, E. R. y Bevan, A. (2021). Inference from large sets of radiocarbon dates: Software and methods. *Radiocarbon*, 63(1), 23-39.
- Crema, E. R., Habu, J., Kobayashi, K. y otros. (2016). Summed probability distribution of 14C dates suggests regional divergences in the population dynamics of the Jomon period in eastern Japan. *PLoS ONE*, 11(4), e0154809.
- de Saint Pierre, M.; Gandini, F.; Perego, U. A.; *et al.* (2012). Arrival of paleo-indians to the southern cone of South America: new clues from mitogenomes. *PLoS One*, 7(12), e51311.
- Endicott, P. y Ho, S. Y. (2008). A Bayesian evaluation of human mitochondrial substitution rates. *The American Journal of Human Genetics*, 82(4), 895-902.
- Heaton, T. J., Köhler, P., Butzin, M. y otros. (2020). Marine20-The marine radiocarbon age calibration curve (0-55,000 cal BP). *Radiocarbon*, 62(4), 779-820.
- Heled, J. y Drummond, A. J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 289.
- Ho, S. Y. y Shapiro, B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 423-434.
- Hogg, A. G., Heaton, T. J., Hua, y otros. (2020). SHCal20 southern Hemisphere calibration, 0-55,000 years cal. BP. *Radiocarbon*, 62(4), 759-778.
- Llano, C., de Porrás, M. E., Barberena, y otros. (2020). Human resilience to Holocene climate changes inferred from rodent middens in drylands of northwestern Patagonia (Argentina). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 557, 109894.
- Moraga, M. L., Rocco, P., Miquel, J. F. y otros. (2000). Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: impli-

- cations for the peopling of the southern cone of the continent. *American Journal of Physical Anthropology*, 113(1), 19-29.
- Motti, J. M. B. (2012). *Caracterización de linajes maternos en la población actual del noroeste y centro-oeste argentinos* [Tesis Doctoral inédita]. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Perez, S. I.; Postillone, M. B.; Rindel, D. (2017). Domestication and human demographic history in South America. *American Journal of Physical Anthropology*, 163, 44-53.
- Perez, S. I.; Postillone, M. B.; Rindel, D.; *et al.* (2016). Peopling time, spatial occupation and demography of Late Pleistocene-Holocene human population from Patagonia. *Quaternary International*, 425, 214-223.
- Postillone, M. B., Cobos, V. A., Urrutia, C. y otros (2019). Mitochondrial DNA diversity and evolutionary history of native human populations of Argentinean northwest Patagonia. *Human Biology*, 91(2), 57-79.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., y otros. (2018). Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901-904.
- R-Development Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Roughgarden, J. (1979). *Theory of population genetics and evolutionary ecology: an introduction* (1ra ed.). New York: Macmillan Publishing Company.
- Rozas, J. (2009). "DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP". En Posada D. (Ed.). *Bioinformatics for DNA sequence analysis. Methods in molecular biology* 537 (pp. 337-350). Humana Press.
- Soares, P., L. Ermini, N. Thomson M. y otros. (2009). Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. *The American Journal of Human Genetics*, 84(6), 740-759.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G. y otros. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), vey016.

- Surovell, T. A., Finley, J. B., Smith, G. M., y otros. (2009). Correcting temporal frequency distributions for taphonomic bias. *Journal of Archaeological Science*, 36(8), 1715-1724.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A. y Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. *Cladogram estimation*. *Genetics*, 132(2), 619-633.
- Timpson, A.; Barberena, R.; Thomas, M. G.; *et al.* (2021). Directly modelling population dynamics in the South American Arid Diagonal using 14C dates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376, 20190723.

FACTORES INMUNOHISTOQUÍMICOS PRONÓSTICOS PARA LAS RECIDIVAS LOCALES EN LAS CIRUGÍAS CONSERVADORAS DEL CÁNCER DE MAMA

*Díaz, Pablo Javier*¹

Introducción

Dentro del control evolutivo post-tratamiento conservador del cáncer de mama se encuentra la posibilidad de la recidiva local, siendo en general su diagnóstico más devastador o psicológicamente difícil que el diagnóstico inicial de cáncer de mama; este evento presenta una incidencia que varía entre un 10-35 % y un 3-10 %, respondiendo a diversos factores, que incluyen el subtipo molecular según las diferentes publicaciones.

El uso de factores predictivos permitiría delimitar el grupo de pacientes con mayor riesgo de recaída y que se beneficiaría de un tratamiento adyuvante. En 1896, George Beatson publicó el primer estudio al respecto y desde entonces ha sido enorme el esfuerzo por encontrar los factores que puedan predecir su pronóstico, convirtiéndose en uno de los temas más controversiales en esta enfermedad.

Un factor pronóstico es concebido como una característica que, por si sola o en combinación con otra, es capaz de dar información

¹ Médico, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Especialista Jerarquizado en Ginecología, Colegio de Médicos Prov. De Bs.As. II. Mastólogo, Sociedad Argentina de Mastología. Profesor de Citología, Histología y Embriología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Jefe del Servicio de Ginecología del HZGA Dr. Eduardo Wilde.

sobre la evolución clínica de un paciente. Su utilidad depende de una serie de requisitos dentro de los cuales encontramos que su cuantificación debe ser estandarizable y reproducible y a su vez debe tener una buena capacidad de discriminación pronóstica.

Objetivos

General

Determinar la importancia de los factores inmunohistoquímicos en la recidiva local del cáncer de mama tratado de manera conservadora.

Específicos

- Seleccionar a las pacientes con estadios I y IIA tratadas con cirugía conservadora y radioterapia, cargadas en el Registro de Cáncer Mama de la Sociedad Argentina de Mastología.
- Segregar (en base al pool de anterior) a las pacientes con y sin recidiva.
- Caracterizar y comparar los grupos anteriores en relación a la edad, el estado menopáusico y el perfil molecular.
- Determinar si la edad, el estado menopáusico y el perfil molecular influyen como variables independientes en las recurrencias.

Hipótesis

Los valores de expresión de la inmunohistoquímica pueden pronosticar que pacientes tiene más probabilidad de recaer.

Material y método

Se realizará un estudio observacional analítico retrospectivo, tomando como base a las pacientes que han sido cargadas en el Registro de Cáncer de Mama de la Sociedad Argentina de Mastología, previa autorización de dicha entidad.

Considerando que el total de las pacientes cargadas es cercano a 10.000, y el valor de las recidivas oscila en promedio en un 10%, se prevé que el valor del número total de casos será cercano a 1.000. El universo de estudio estará comprendido por aquellas pacientes que hayan sido intervenidas quirúrgicamente con técnicas conservadoras (presentando márgenes libres, con tumores menores a 5 cm y realizado la radioterapia correspondiente) y posteriormente presentado un diagnóstico citológico y/o histológico de recidiva local.

Se confeccionará una base de datos con todas las variables a analizar en el programa Microsoft Office Excel, las cuales se clasificarán, agruparán y representarán en tablas y gráficos para el análisis de las frecuencias absolutas y porcentuales. Posteriormente se hará una aproximación analítica entre las variables con herramientas de la estadística en relación a investigaciones clínicas.

Criterios de exclusión:

- Márgenes comprometidos según anatomía patológica.
- Estadios mayores a IIA (tumores mayores a 5 cm).
- No haber realizado radioterapia.

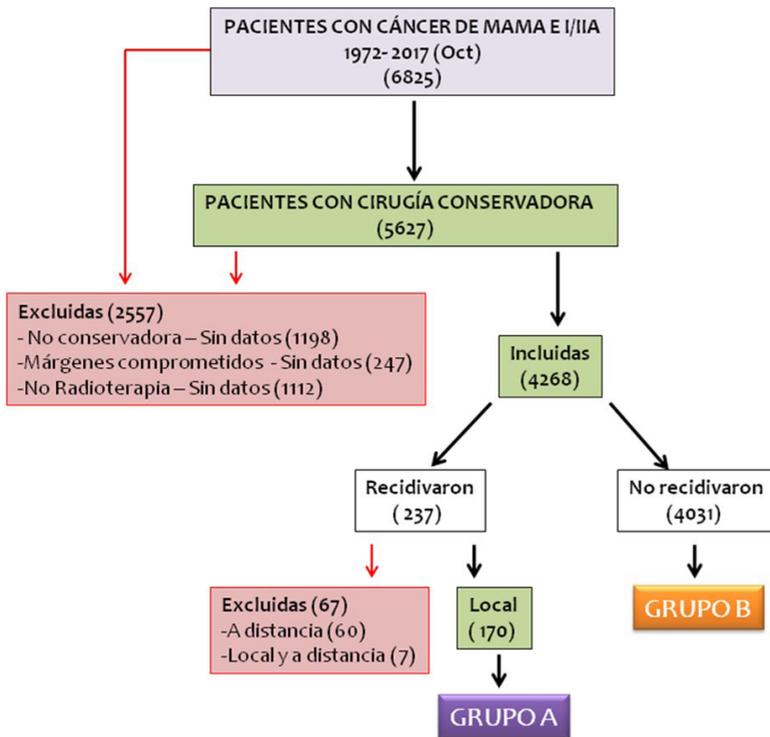
Las variables que se analizarán serán las siguientes:

- Edad de la paciente.
- Estado menopáusico.
- Tipo de cirugía mamaria.
- Estudio de los márgenes.
- Realización de radioterapia.
- Estadio pTNM.
- Tipo Histológico del tumor.
- Tipo molecular del tumor.
- Valoración cuali y cuantitativa de los receptores de estrógeno, progesterona, her 2 neu y de proliferación.

Resultados

En base a los datos del Registro de Cáncer de Mama de la Sociedad Argentina de Mastología, entre los años 1972 y 2017 (octubre), 6825 mujeres fueron diagnosticadas e intervenidas quirúrgicamente por un carcinoma de mama en estadios I/IIA. El 82,4 % (5627) de ellas fue sometida a una cirugía conservadora, a su vez a un 16,4 % (1118) se le practicó una mastectomía, mientras que el 1,2 % (80) restante no aportó datos respecto del tipo de cirugía recibido. (Tabla 1) (Gráfico 1)

Del total de pacientes sometidas a una cirugía conservadora (5627), el 95,6 % (5380) presentó márgenes libres de sección; y de este pool solo el 79,3 % (4268) realizó terapia radiante. (Tablas 2 y 3)



Mastectomía	1118	16,4 %
Resección Sectorial	5627	82,4 %
No Aporta Datos	80	1,2 %
TOTAL	6825	100 %

Tabla 1. Tipo de cirugía en pacientes con carcinoma mamaria en Estadios I/IIA

Compromiso Extensivo	29	0,5 %
Compromiso Focal	100	1,7 %
Libre	5380	95,6 %
No Aporta Datos	118	2,2 %
TOTAL	5627	100 %

Tabla 2. Estudio de los márgenes de sección de las pacientes tratadas de manera conservadora

Si	4268	79,3 %
No	136	2,5 %
No Aporta Datos	976	18,2 %
Total	5380	100 %

Tabla 3. Pacientes con márgenes libres de sección en cirugía conservadora que recibieron radioterapia

En relación a estas 4268 pacientes, es que se las dividió en aquellas que habían presentado recidiva y en aquellas que no. Dentro del primer grupo se ubicó el 5,6 % de las pacientes, mientras que en el segundo el 94,4 % restante (Tabla 4), las pacientes que presentaron recidivas fueron sub-clasificadas en relación al tipo, arrojando los siguientes resultados: un 25,4% (60) presentó recidiva a distancia, un 71,7% (170) local y un 2,9 % (7) local y distancia. (Tabla 5)

Si	237	5,6 %
No	4031	94,4 %
Total	4268	100 %

Tabla 4. Valores de recidiva de pacientes que fueron sometidas a cirugía conservadora, con márgenes libres y terapia radiante.

A Distancia	60	25.4 %
Local	170	71,7 %
Local y a Distancia	7	2.9 %
Total	237	100 %

Tabla 5. Tipo de recidivas en pacientes con resección parcial, márgenes libres y radioterapia

Para presentar y sistematizar los datos obtenidos según las variables mencionadas en la metodología, es que las pacientes objeto de estudio fueron divididas en dos grupos, a saber:

GRUPO A: Pacientes que han realizado una cirugía conservadora (con márgenes de sección libres y la consiguiente radioterapia) y presentado una recidiva local.

GRUPO B: Pacientes que han realizado una cirugía conservadora (con márgenes de sección libres y la consiguiente radioterapia) y no han presentado una recidiva local.

Respecto de las pacientes del Grupo A, estas han mostrado una edad media de diagnóstico inicial de 50,9, con una moda de 48 y una mediana de 49 años, siendo el rango etario de 27 a 81 años. De las 170 pacientes totales el 49,4 % (84) presentó menopausia al momento del diagnóstico.

Los patrones histológicos más frecuentes fueron el carcinoma ductal invasor (77%), el lobulillar invasor (11.8%), seguido a las distancias

con igual valor por los carcinomas mixto invasor y tubular invasor (2,3% cada uno).

En relación a la clasificación molecular, el 14,2% no pudo ser determinada por falta de datos. Mientras tanto el 63,5% se comportó como Luminal A/B, el 10,6% como Luminal B Her, el 8,8% como Triple Negativo, el 2,3 % como Her y el 0,6% como RE- RP+.

Los datos arrojados por las determinaciones inmunohistoquímicas para este grupo fueron las siguientes.

- *Receptor de Estrógenos*: Fue negativo en el 26,5% (45) y positivo en el 73,5%, con una media, mediana y moda de expresión del 60,06 %, 70 y 90 respectivamente.
- *Receptor de Progesterona*: Esta prueba resultó negativa en el 31,8% (54) y positiva en el 68,2% (116) de los casos. En relación a los valores de expresión, estos fueron de 54,97 para la media, 40 para la mediana y 10 para la moda.
- *Her 2-Neu*: Los datos aunados de las técnicas de IHQ y FISH para este receptor determinaron que el 43% de las pacientes eran Her negativo y el 7% Her positivo, mientras que el 50% restante no realizó la prueba.
- *Marcador de Proliferación*: Esta variable no fue consignada en el 78,8% de las pacientes, y resultado ser bajo en el 8,2%, intermedio en el 5,9% y alto en el 7,1%.

Las pacientes del Grupo B, han presentado una edad media de diagnóstico inicial de 58,06, con una moda de 60 y una mediana de 58 años, siendo el rango etario de 24 a 91 años. Dentro de ellas el 69,4 % (2798) ha presentado un estado menopáusico.

En orden decreciente, los cuatro diagnósticos anatómo-patológicos más frecuentes fueron el carcinoma ductal invasor (69,4%), el carcinoma lobulillar invasor (10,61%), el carcinoma invasor mixto (3,9%) y el carcinoma invasor tubular (3,7%).

En relación a la clasificación molecular, el mayor porcentaje de los carcinomas se comportó como Luminal A/B (65,9%), seguido de lejos

Edad	Media	50,9	
	Moda	48	
	Mediana	49	
	Rango	27 a 81	
Menopausia	Si	84	49,4 %
	No	86	50,6 %
Tipo Histológico	Invasor Apócrino	1	0,6%
	Invasor Ductal	131	77%
	Invasor Lobular	20	11,8%
	Invasor Medular	1	0,6%
	Invasor Mixto	4	2,3%
	Invasor Mucinoso	3	1,8%
	Otros Invasores	2	1,2%
	Invasor Papilar	2	1,2%
	Invasor Tubular	4	2,3%
	CDIS	2	1,2%
	Clasificación Molecular	Luminal (A/B)	108
Luminal B / Her		18	10,6%
RE-/RP+/ Her-		1	0,6%
HER		4	2,3%
TN		15	8,8%
Imposible determinar		24	14,2%

RP	Negativo	54	31,8%			
	Positivo	116	68,2%			
		Porcentaje de Expresión	Media	54,97%		
			Mediana	40		
Moda	10					
RE	Negativo	45	26,5%			
	Positivo	125	73,5%			
			Media	60,06		
			Mediana	70		
Moda	90					
HER (IHQ)	Negativo	72	43,4%			
	Positivo	12	7%			
	No Realizó	85	50%			
	Incierto	1	0,6%			
		Confirno por FISH	SI	1	Positivos	0
					Negativos	1
NO	0					
Ki-67	No realizaron	134			78,8%	
	Si Realizaron	Bajo	14		8,2%	
		Intermedio	10		5,9%	
		Alto	12		7,1%	

Tabla 6. Perfil de las pacientes del Grupo A

Edad	Media	58,06	
	Moda	60	
	Mediana	58	
	Rango	24 – 91 años	
Menopausia	Si	2798	69,4 %
	No	1233	30.6 %
Tipo Histológico	Invasivo Ductal	2978	73,87 %
	Invasivo Lobular	428	10,61 %
	Invasivo Escamoso	5	0.1
	Invasivo Medular	30	0.7
	Invasivo Mixto	159	3,9 %
	Invasivo Mucinoso	102	2.5
	Invasivo Papilar	76	1.8
	Invasivo Secretorio	2	0.04
	Invasivo Tubular	150	3,7 %
	Otros invasivos	40	1
	Invasivo Adenoide	2	0.04
	Invasivo Apocrino	11	0.3
	Oculto	1	0.02
	Paget	1	0.02
	CLIS	5	0.12
	CDIS	40	1

Clasificación Molecular	Luminal (A/B)	2659	65,9%		
	Luminal B- Her	194	4,8%		
	RE-/RP+	Her -	37	0,9%	
		Her +	9	0,2%	
		Sin determinación para her	14	0,3%	
	Her 2	89	2,3%		
	TN	225	5,7%		
	Imposible determinar por falta de alguna determinación	804	19,9%		
RP	No realizaron	83	2 %		
	Negativo	697	17,3 %		
	Positivo	3251	80,7 %		
		Porcentaje de Expresión	Media	65.87 %	
			Mediana	75 %	
Moda	100 %				
RE	No realizaron	80	2 %		
	Negativo	462	11,5 %		
	Positivo	3489	86,5 %		
		Porcentaje de Expresión	Media	77.73%	
			Mediana	90%	
Moda	100%				

HER (IHQ)	Negativo (descontados los que positivizaron con FISH)	2854	70,8 %			
	Positivo	257	6,4%			
	No Realizó	783	19,4%			
	Incierto	131	3,2%			
		Confirmando por FISH	SI	97	Positivos	30
NO			34	Negativos	67	69,1%
HER (FISH directo o con HIQ -)		6	0,2%			
Ki-67	No realizaron	1996		49,5%		
	Si Realizaron	Bajo	1173	29,1%		
		Intermedio	428	10,6%		
		Alto	434	10,8%		

Tabla 7. Perfil de las Pacientes del Grupo B

por los triples negativos (5,7%), los Luminales B- Her (4,8%), los Her 2 (2,3%), y un pequeño grupo con RE- y RP+ (1.4%). Cabe aclarar que un 19.9 % (804) del total del Grupo B no pudo ser clasificado molecularmente dado que presentaban ausencia de alguna o todas las determinaciones inmunohistoquímicas.

Analizando de manera separada las determinaciones inmunohistoquímicas, este grupo de pacientes presentó las siguientes características:

- *Receptor de Estrógenos*: Del total de pacientes de este grupo, solo un 2% (80) no realizó su determinación. Dentro del grupo restante, el 11,5% (462) arrojó un resultado negativo, y el 85,5 %

(3489) uno positivo. Analizando cuantitativamente la expresión positiva la media fue de 77,73%, con una mediana y una moda de 90% y 100% respectivamente.

- *Receptor de Progesterona*: Para esta determinación, hubo un 2,1% (83) que no realizó su estudio, un 17,2 % (697) que fue negativo y un 80,7% (3251) positivo. Respecto de la expresión en el último grupo, la misma presentó una media de 65,87%, una mediana de 75% y una moda del 100%.
- *Her2-Neu*: Esta prueba no fue realizada por el 19,4% (783) de los pacientes del Grupo B. Aunando los resultados de las determinaciones por IHQ y FISH, en el 72,5 % (2921) resultó ser negativo, positivo en el 7,3% (293) e incierto en el 0,8% (34).
- *Marcador de Proliferación*: Esta variable no fue estudiada en el 49,5% (1996) de los pacientes. Dentro de las que sí lo realizaron, hubo una marcación de proliferación baja en el 29,1 % (1173), intermedia en el 10,6% (428) y alta en el 10,8% (434).

Los datos obtenidos de las recidivas en relación al tumor primario (Tabla 8 y 9), arrojaron que el intervalo, en años, entre las mismas fue de 6,23 para la media, 5 para la mediana y 4 para la moda, con un rango que fue de menos de 1 a 23 años. Así mismo el 55,3% (94) de los casos tuvo lugar dentro de los primeros 5 años.

Respecto de los datos que continúan, los mismos fueron obtenidos de 143 pacientes, ya que los 27 restantes solo aportaron la fecha de recidiva.

En el 73,4% (105) de los casos la histopatología del tumor primario y la recidiva fue coincidente, mientras que la misma comparación respecto del perfil clasificatorio molecular arrojó que solo hubo coincidencia en el 42,7% (61).

A continuación, se muestran los datos de los estudios inmunohistoquímicos por separado:

- *Receptor de Estrógeno*: Su expresión (tanto positiva como negativa) se mantuvo coincidente en el 81,8 % (117) de los casos.

Años entre tumor primario y recidiva	Media	6.23 años	
	Mediana	5	
	Moda	4	
	Intervalo	<1 año – 23 años	
Coincidencia de la Anatomía Patológica	SI	105	73.4 %
	NO	38	26.6 %
Mantención del mismo perfil molecular (RE, RP, HER2)	SI	61	42,7%
	NO	82	57,3 %
Coincidencia de RE	SI	117	81,8 %
	NO	26	18,2 %
Coincidencia de RP	SI	104	72,2 %
	NO	39	27, 8%
Coincide HER-2	SI	81	56,6 %
	NO	57 (solo 1 negativizó)	39,8 %
	NO REALIZÓ	5	3, 6%
Coincide prolifer	SI	19	13, 3%
	NO	9 (Solo 1 subió)	6,3 %
	NO REALIZÓ	115	80,4 %

Tabla 8. Comparación del tumor primario con la recidiva

Tiempo libre de enfermedad en años	Cantidad de pacientes
menor a 1	3
1	15
2	17
3	18
4	22
5	19
6	10
7	12
8	9
9	10
10	5
11	6
12	7
13	6
14	1
15	3
16	2
17	0
18	1
19	0
20	2
21	1
22	0
23	1

Tabla 9. Cantidad de recidivas según años

- *Receptor de Progesterona*: En este caso la coincidencia fue del 72,2% (104).
- *Her2-Neu*: Esta prueba fue concordante en poco más de la mitad de los casos, siendo su valor de 56,6% (81), cabe destacar que dentro del 39,8 % (57) no coincidente el 98,3% (56) positivizó su expresión.
- *Marcador de Proliferación*: El mismo no fue realizado en el 80,4% (115) de las pacientes, siendo coincidente en el 13,3% (19) y no coincidente en el 6,3% (9).

Discusión

Actualmente, en aquellas pacientes que presentan estadios iniciales de cáncer de mama, la cirugía conservadora (con evaluación axilar y radioterapia posterior) se presenta como el tratamiento de elección (Veronesi *et al.*, 2002; Botteri *et al.*, 2010). Acorde con ello, en esta serie, esta terapéutica representó el 82.4% de los casos.

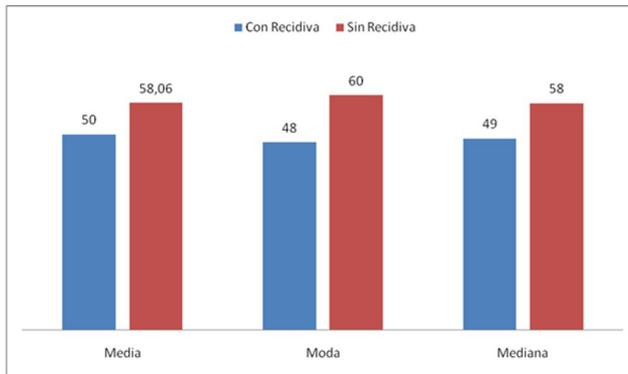
En relación a la incidencia de recidiva local luego de una cirugía conservadora, en las distintas series publicadas, tanto nacionales como internacionales, esta varía entre un 4,1% y 18,0% (Bernadello *et al.*, 1993; Nottage *et al.*, 2006). Estos datos concuerdan con los obtenidos en la serie del presente trabajo, el cual establece la incidencia en un 5,6% (Tabla 10).

Es variada la bibliografía que analiza la edad de la paciente como un factor pronóstico de las recidivas luego de una cirugía conservadora (Bernadello *et al.*, 1993; Núñez de Pierro *et al.*, 2004; González Zimmermann, 2010; Arvold *et al.*, 2011); en línea con estas, este trabajo encontró que las pacientes que recidivaron fueron más jóvenes que las que no, haciéndolo 8 años antes respecto de la media, 12 de la de moda y 9 de mediana, promediando la edad de presentación los 50 años, siendo la edad mayor frecuencia los 48 años (Gráfico 2).

Cerca del 70% de las pacientes que no recidivaron eran postmenopáusicas; como contrapartida, el 50,6% de las pacientes con recidiva eran premenopáusicas (Gráfico 3). Entendiendo, al igual que otras

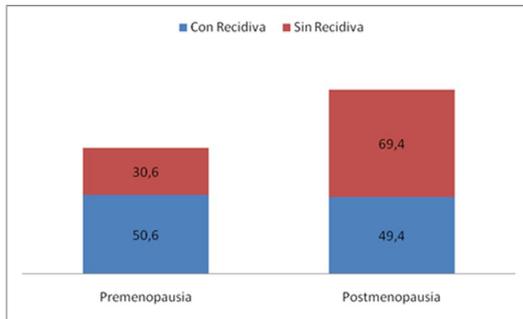
Autor	Año	Cantidad de pacientes	% de recidiva
Mc Lean	1998	165	6,6
Gori	1988	78	7,5
Bernardello	1993	128	11,7
Núñez De Pierro	2004	1306	10
Barbera	2005	409	8
Zimmermann	2010	717	10,2
Vuoto	2012	830	10,5
Ghiraldo	2012	413	8,96
Barchuk	2014	1904	9,1
Locatelli	2016	450	6,2
Díaz (RCM – SAMAS)	2017	4268	5,6

Tabla 10. Incidencia de recidiva local en series nacionales.
(Tomado y modificado de Locatelli)



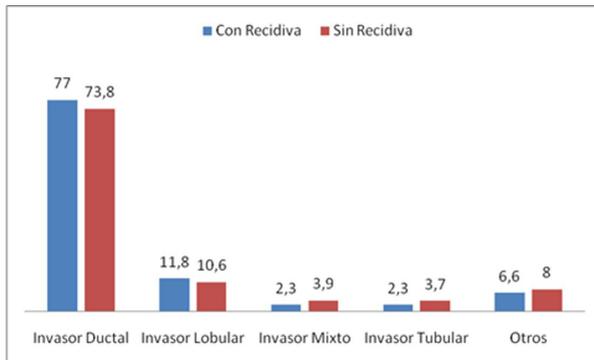
Edad de las pacientes con y sin recidiva

Gráfico 2



Relación entre estado menopáusico y recidiva

Gráfico 3



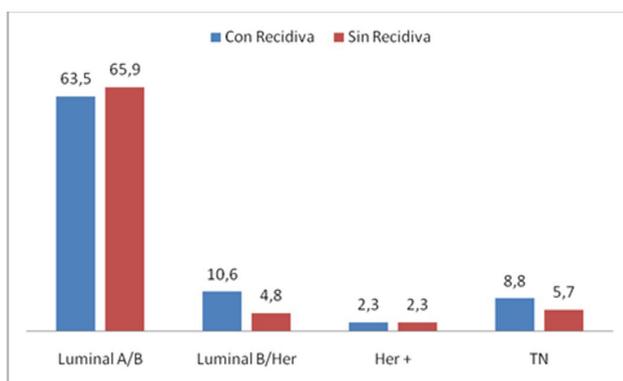
Tipos histológicos según frecuencia en grupos con y sin recidiva

Gráfico 4

publicaciones, a la menopausia como un factor protector de la recidiva (Locatelli *et al.*, 2018; Voogd *et al.*, 1999; Wasif *et al.*, 2010).

En acuerdo a lo concluido por Locatelli *et al.* (2018), Wasif *et al.* (2010) y Vuoto *et al.* (2012), el tipo histológico del tumor no parece ser un factor pronóstico, ya que en ambos grupos estudiados el patrón estadístico de presentación fue el mismo, siendo el carcinoma ductal invasor el, estadísticamente, mayor responsable de los tumores en la población objeto de estudio (Gráfico 4).

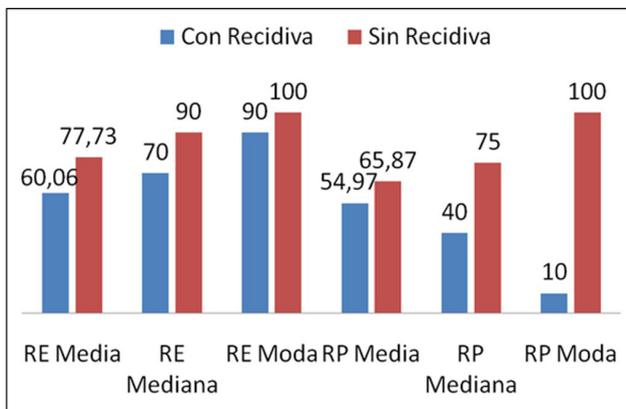
De manera similar ocurrió respecto de los tipos moleculares; en ambos grupos los tumores Luminales A/B representaron la gran mayoría de los mismos. Este tumor fue seguido (a una distancia mayor de 10 puntos promedio) en orden por el Luminal B-Her, para las pacientes con recidiva y por el Triple Negativo, para las que no tuvieron recidiva (Gráfico 5). Por lo que se interpreta, en relación a estos resultados, que la clasificación molecular como variable pronóstica de recidivas locales luego de una cirugía conservadora no sería de utilidad.



Tipos moleculares según frecuencia en grupos con y sin recidiva

Gráfico 5

Este punto entra en conflicto con varias publicaciones que sostienen que los tumores Her y Triple Negativos presentan una mayor tasa de recaída que los tipos Luminales (Arrechea Irigoyen *et al*, 2011; Yang *et al.*, 2007; Spitale *et al.*, 2009; Metzger-Filho *et al.*, 2013; Salido Fernández *et al.*, 2015). En contrapartida, las series nacionales reportadas de manera separada en sesiones de la Sociedad Argentina de Mastología por Zimmermann (2010), Locatelli (2018) y Ghiraldo (2012), apoyan la relación inconexa del tipo molecular con las recidivas, al igual que este trabajo.



Expresión cuantitativa de los receptores de estrógeno y progesterona para ambos grupos

Gráfico 6

Analizando por separado las determinaciones inmunohistoquímicas que se utilizan para la clasificación molecular, vemos que el Receptor de Estrógenos muestra una mayor expresión cuanti-cualitativa en el grupo sin recidivas; siendo en este grupo positivo en el 86,5% con valores de expresión media de 77,73%, mediana del 90% y moda del 100%; contra una positividad del 73,5% y expresiones con media de 60,06%, mediana del 70% y moda del 90 % en las pacientes que si recidivaron.

Comparativamente ocurrió lo mismo respecto de los Receptores de Progesterona, pero con diferencias más marcadas, siendo positivo en el 68,2% en las pacientes con recidiva y en el 80,7% en las pacientes sin segundo episodio, con media de expresión del 54,97 % y 65,87%, mediana de expresión de 40% y 75% y modas de 10% y 100% respectivamente (Gráfico 6).

En relación al Her 2 neu, su análisis merece mencionar que la cantidad de pacientes que no lo realizó su determinación fue alto (19,4% para el grupo A y 50% para el B). Pero en función de los datos de este

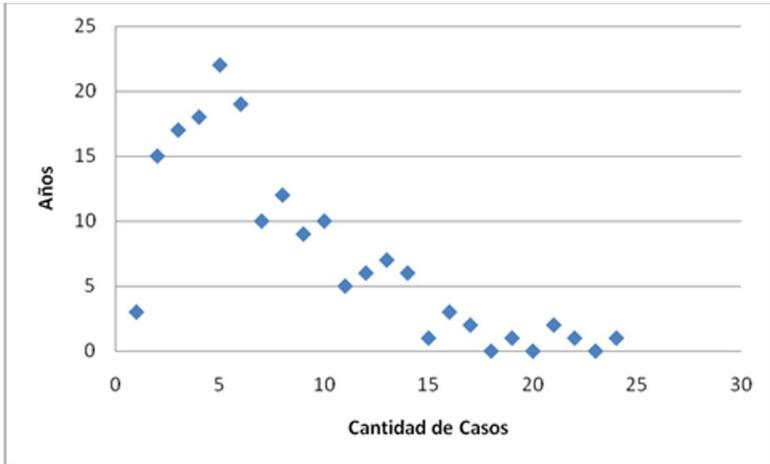
trabajo su no expresión pareciera ser protectora de la recidiva, dado que en el grupo sin recaída su valor negativo fue del 72,5% mientras que en el grupo con segundo episodio fue negativo solo en el 43%.

En base a este análisis se puede conjeturar que los valores de expresión máximos de los receptores tanto estrogénicos como progestágenos están relacionados con una protección para las recaídas locales. Tomando en cuenta las modas presentadas para ambas determinaciones, los valores de expresión del 100% serían un factor de buen pronóstico para las recaídas, mientras que valores cercanos o inferiores al 70 % para el receptor de estrógeno y cercanos al 40% para el de progesterona serían pronósticos de una recidiva local. En línea con estos resultados, es que este trabajo apoya la importancia pronostica respecto de la controversia del receptor progestágeno (Liu *et al.*, 2009; Palacios, 2012).

En referencia del análisis de los marcadores de proliferación, estos no pueden ser tomados en cuenta para la comparación de los grupos, ya que en las pacientes con recidiva no fue realizado en el 78,8% de los casos.

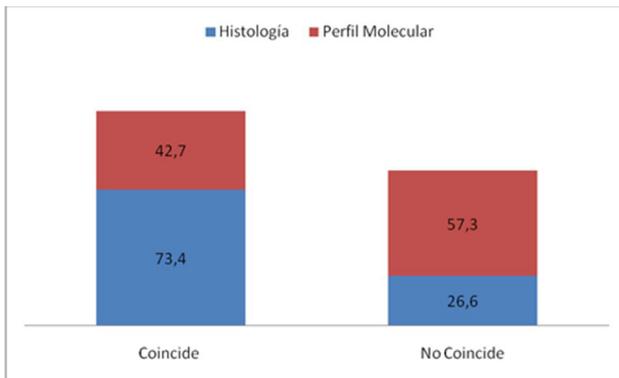
Analizando ahora el comportamiento de las recidivas en relación al tumor primario, en esta serie se estableció que en promedio la recidiva se da a los 6.23 años, siendo la mediana de 5 y la moda de 4 años (Gráfico 7). Sabiendo que el tiempo libre de enfermedad es variable, y habiéndose referido casos desde meses a 20 años o más (ocurriendo la mayoría de ellas en los primeros 5 años postcirugía) es que nuestro resultado encuadra con los de series nacionales e internacionales (Tabla 9). (Zimmermann *et al.*, 2010; Locatelli *et al.*, 2018; Chu *et al.*, 1976; Hilsenbeck *et al.*, 1998).

Centrándonos en la coincidencia o no de los aspectos histológicos y moleculares, los datos demuestran que en la gran mayoría de los casos se mantiene la misma anatomía patológica; cuestión que no ocurre con el perfil molecular, dado que en el 57,3% de los casos este cambia, principalmente a expensas de la positividad del Her 2 neu (Gráfico 8 y 9).



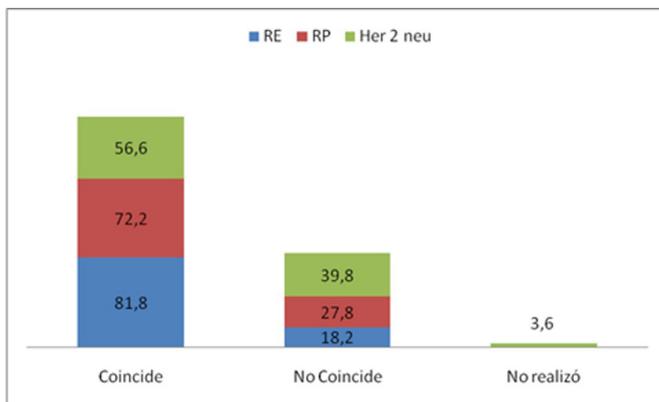
Curva de dispersión de casos de recidivas según años

Gráfico 7



Coincidencias de la histología y perfil molecular entre el tumor primario y su recidiva local.

Gráfico 8



Coincidencias de expresión de receptores entre el tumor primario y su recidiva local

Gráfico 9

En relación a esto, el grupo de trabajo de Palacios sostiene que bajo el término recidiva local tienden a incluirse dos situaciones clinicopatológicas diferentes: la verdadera recidiva local (RL) y el desarrollo de un nuevo cáncer primario (CP), siendo su diferenciación de gran trascendencia clínica. La distinción entre RL y CP se ha realizado tradicionalmente atendiendo a criterios clínicos y morfológicos. Las lesiones desarrolladas en el lugar de la intervención previa, o cercanas, con características morfológicas similares han sido consideradas como RL, mientras que las localizadas a distancia, o con características histopatológicas muy diferente, han sido consideradas CP. El análisis molecular permite un diagnóstico diferencial más preciso entre RL y CP. Es así que se ha sugerido que aproximadamente el 70% de las lesiones que aparecen tras cirugía conservadora son verdaderas RL y el restante 30% CP, valores muy disimiles de los reportados en este trabajo (Palacios, 2012).

Para explicar que ocurre en las neoplasias que convierten sus receptores, hay varias hipótesis, que incluyen a la heterogeneidad del

tumor con clones negativos, a las alteraciones en la fracción de crecimiento, a las formas aberrantes del receptor y a influencia del tratamiento hormonal adyuvante (Fernández Parra y Bernet Veguéb, 2002).

Conclusión

La edad promedio de presentación de las pacientes con recidivas locales, luego de una cirugía conservadora, es de 50 años con una moda de 48 años.

Las pacientes con estado menopáusico presentaron menor número de recidivas locales.

El tiempo libre de enfermedad presenta una mediana de 6.3 años, con una moda de 4.

El tipo histológico y molecular *cualitativo* de los tumores primarios no son pronósticos de las recidivas locales, ya que estas variables mostraron el mismo patrón en las pacientes con y sin recidiva.

El análisis *cuantitativo* e individual de los receptores pueden brindar información pronóstica, principalmente el receptor de progesterona, el cual cuando tiene menor valor de expresión se asocia a mayor posibilidad de recidiva local (luego de una cirugía conservadora).

Referencias bibliográficas

- Arrechea Irigoyen, M.A.; Vicente García, F.; Córdoba Iturriagoitia, A.; Ibáñez Beroiz, B.; Santamaría Martínez, M.; Guillén Gima, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2011, Vol. 34, N° 2, mayo-agosto
- Arvold, N.; Taghian, A.; Niemierko, A.; Abi Raad, R.F.; Sreedhara, M.; Nguyen, P. L.; Bellon, J.R.; Wong, J. S.; Smith, B.L.; Harris, J.R. (2011). Age, Breast Cancer Subtype Approximation, and Local Recurrence After Breast-Conserving Therapy. *J Clin Oncol*; 29 (29): 3885-3891.

- Bernardello, E.; Margossian, J.; Müller Perrier, G.; Otero Vázquez, D.; Bustos, J.; Margossian, A.; Minuto, F. (1993). Recidivas locorregionales del tratamiento conservador del cáncer de mama. *Rev Arg Cirug*; 64: 150- 154.
- Botteri, E.; Bagnardi, V.; Rotmensz, N.; Gentilini, O.; Disalvatore, D.; Bazolli, B.; Luini, A.; Veronesi, U. (2010). Analysis of local and regional recurrences in breast cancer after conservative surgery. *Ann Oncol*; 21 (4): 723-8
- Chu, F.C.; Lin, F.J.; Kim, J.H.; Huh, S.H.; Garmatis, C.J. (1976). Locally recurrent carcinoma of the breast. Results of radiation therapy. *Cancer* 1976; 37: 2677-2681.
- Fernández Parra, J.; Bernet Vegué, E. (2002). Receptores hormonales en cáncer de mama. *Rev Senología y Patol Mam* 2002;15(3):115-22.
- Ghiraldo, L.; Elizalde, R.J.; Newman, M.; Schiavi, C.; Recaman, N.; Alexenicer, C.; Solucci, C.; Jarolasvsky, M.J. (2012). Factores asociados a recidiva local en el tratamiento conservador del cáncer de mama invasivo. *Rev Arg Mastol* 2012; 31 (111): 147-158
- González Zimmermann, A.; Uriburu, J. L.; Vuoto, H. D.; García, A. M.; Candás, G.B.; Isetta, J. A. M.; Cogorno, L.; Bernabó, O. L. (2010). Factores de riesgo de recidiva local luego de tratamiento conservador en cáncer de mama. *Revista Argentina de Mastología*; 29(103): 101-114.
- Hilsenbeck, S.G; Ravdin, P.M.; de Moor, C.A.; Chamness, G.C.; Osborne, C.K.; Clark, G.M. (1998). Time dependence of hazard ratios for prognostics factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:227-237.
- Liu, S.; Chia, S.K.; Mehl, E.; Leung, S.; Rajput, A.; Cheang, M.C.U.; Nielsen, T.O. (2009). Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*.
- Locatelli, M.C.; Guscelli, C.; Nicastro, A.; Feijoó, M.M.; Poberaj, G.; Salazar Moltrasio, L. (2018). Tratamiento conservador del cáncer

- de mama y factores pronósticos de recidiva local. *Revista Argentina de Mastología*, volumen 36, N° 133.
- Metzger-Filho, O.; Sun, Z.; Viale, G.; Price, K.N.; Crivellari, D.; Snyder, R. D.; Gelber, R.D.; Castiglione- Gertsch, M.; Coates, A.S.; Goldhirsch, A.; Cardoso, F. (2013). Patterns of Recurrence and Outcome According to Breast Cancer Subtypes in Lymph Node-Negative Disease: Results From International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX. *J Clin Oncol* 2013; 31 (25): 3083-90
- Nottage, M.K.; Kopciuk, K.A.; Tzontcheva, A.; L'Andrulis, I.; Bull, S.B.; Blackstein, M.E. (2006). Analysis of incidence and prognostic factors for ipsilateral breast tumor recurrence and its impact on disease specific survival of women with node-negative breast cancer a prospective cohort study. *Breast Cancer Research*; 8(4): R44.
- Núñez De Pierro, A.; Allemand, D.; Agejas, G. (2004). Tratamiento conservador del cáncer de mama. Evaluación de los resultados en 1306 casos. Experiencia del grupo de trabajo del Hospital Juan A. Fernández de Buenos Aires. *Revista Argentina de Mastología*; 23(78): 69-93.
- Palacios, J. (2012). Mesa redonda: recidiva local en cáncer de mama. *XXXI Congreso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria*.
- Salido Fernández, S.; Tejedor Togores, P.; López Rojo, I.; Cazorla Jiménez, A.; Benítez Dupin, O.; Rivas Fidalgo, S.; Gómez Ramírez, J.; Días-Miguel Maceda, M. (2015). Incidencia y seguimiento a 5 años de la recidiva locorregional durante 4 años consecutivos en una unidad multidisciplinar de patología mamaria. *Rev Senol Patol Mamar*. 2015;28(3):113---119
- Spitale, A.; Mazzola, P.; Soldini, D.; Mazzucchelli, L.; Bordoni, A. (2009). Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009; 20: 628-635

- Veronesi, U.; Cascinelli, N.; Mariani, L.; Greco, M.; Saccozzi, R.; Luini, A.; Aguilar, M.; Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*; 347 (16): 1227-32.
- Voogd, A.C.; Peterse, J.L.; Crommelin, M.A.; Rutgers, E.J.; Botke, G.; Elkhuizen, P.H.; Van Geel, A.N.; Hoerkstra, C.J.; Van Pel, R.; Van de Vijver, M.J.; Coebergh, J.W. (1999). Histological determinants for different types of local recurrence after breast-conserving therapy of invasive breast cancer. Dutch Study Group on Local Recurrence after Breast Conservation (borst). *Eur J Cancer*; 35 (13): 1828-37
- Vuoto, H. D.; Candas, G.B.; Uriburu J, L.; Isetta, J.A.M.; Cogorno, L.; Freijido, A.S.; García, A.M.; Bernabó, O. L. (2012). Riesgo de recidiva local en la cirugía conservadora: el problema de los márgenes. *Rev Argent Cirug*; 103 (4-5-6): 53-61
- Wasif, N.; Maggard, M.A.; Ko, C.Y.; Giuliano, A.E. (2010). Invasive lobular vs ductal breast cancer: a stage-matched comparison of outcomes. *Ann Surg Oncol*; 17 (7): 1862-69.
- Yang, X.R.; Sherman, M.E.; Rimm, D.L.; Lissowska, J.; Brinton, L. A.; Peplonska, B.; Hewitt, S.M.; Anderson, W.F.; Szeszenia- Dabrowska, N.; Bardin- Mikolajczak, A.; Zatonski, W.; Cartun, R.; Mandich, D.; Rymkiewicz, G.; Ligaj, M.; Lukaszek, S.; Kordek, R.; García- Closas, M. (2007). Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 439-443.

EL ILION COMO ELEMENTO DIAGNÓSTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE SEXO EN RESTOS ÓSEOS DE INDIVIDUOS SUBADULTOS. APORTES A LA ANTROPOLOGÍA FORENSE

García Mancuso, Rocío¹

Introducción

Desde el siglo XVIII, la antropología y la medicina han tenido una prolífica vinculación que dio por resultado enormes avances en el desarrollo de la antropología biológica, o antropología física como se la llamó en sus orígenes (Uberlaker, 2018). Esto llevó, a su vez, a un enorme crecimiento de diversas ramas que involucran la osteología humana. Por un lado, la *antropología forense* se consolidó aplicando el conocimiento desarrollado desde la antropología, la anatomía y las ciencias médicas en la identificación de personas recientemente fallecidas en un contexto legal; por otro, la *paleoantropología*, que estudia principalmente homínidos africanos en contextos paleontológicos, y contribuye a la interpretación de los procesos evolutivos que llevaron a la aparición de los humanos modernos; y también la *bioarqueología* que trabaja sobre la reconstrucción de la dinámica de poblaciones antiguas a partir del estudio de restos óseos humanos en contextos arqueológicos (White, Black y Folkens, 2012).

¹ Licenciada en Antropología y Dra. en Ciencias Naturales por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora de Citología, Histología y Embriología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Investigadora Adjunta CONICET.

La estimación de la edad y la determinación del sexo representan los principales puntos de la reconstrucción del perfil biológico individual. A su vez, al analizar el esqueleto de individuos que aún están transitando el proceso de crecimiento y desarrollo, se debe tener en cuenta que pueden encontrarse una cantidad de indicadores, como la erupción dentaria o la fusión de epífisis, que permiten estimar la edad biológica con bastante certeza, pero la determinación del sexo puede resultar mucho menos accesible.

Esto se debe a que los rasgos observados sobre esqueletos humanos adultos que se han considerado de mayor relevancia para diagnosticar el sexo son aquellos que se definen como caracteres sexuales secundarios, es decir, características físicas no relacionadas con la reproducción pero que tiene diferencias entre los sexos, como la distribución del vello corporal y facial, la distribución del tejido adiposo, el tono de la voz, el índice cintura cadera, la fuerza muscular y robusticidad esquelética. En el estudio de restos óseos humanos este dimorfismo es altamente diagnóstico al observar coxales y cráneo (Fig. 1) (Buikstra y Ubelaker, 1994; Brothwell, 1981).

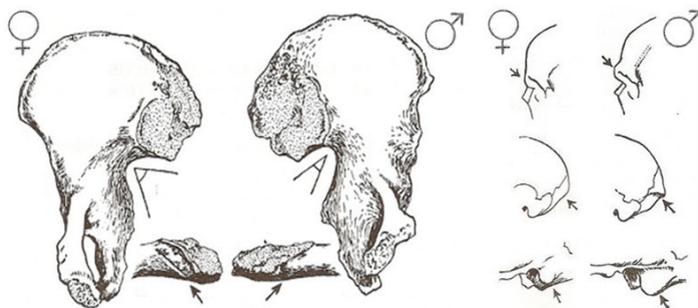


Figura 1. Diferencias sexuales en coxal y cráneo adulto.

Sobre el crecimiento y la conformación de la pelvis

En la especie humana (*Homo sapiens sapiens*) el crecimiento postnatal acontece en diferentes etapas y finaliza promediando la segunda década de vida. Entre los 9 y 18 años ocurre la etapa de empuje puberal en la que hay una aceleración y desaceleración del crecimiento, modificaciones en la composición corporal, desarrollo de las gónadas, órganos de la reproducción y caracteres sexuales secundarios (Cameron, 2002).

La pelvis está considerada como la estructura del esqueleto que ofrece información más fiable para la determinación del sexo en adultos. Su importancia diagnóstica radica en que la pelvis femenina tiene una primordial importancia durante la gestación y el alumbramiento, por lo cual, es probable que sus características hayan evolucionado con nuestra especie. La pelvis humana permite tanto el desplazamiento bípedo, como el desarrollo de un canal de parto apropiado para la expulsión de un recién nacido portador de un cerebro particularmente grande en comparación con otras especies de primates (Leakey, 2000; Huseynov *et al.*, 2016).

La pelvis está constituida por el hueso sacro, el coxis y los coxales. El hueso coxal es particularmente dimórfico y se forma a partir de 3 centros de osificación primarios y 5 secundarios. Ilion, isquion y pubis, constituyen los centros de osificación primarios que se unen en el acetábulo por medio del cartílago trirradiado completando su fusión y la configuración definitiva del coxal entre los 11 y 17 años (Scheuer y Black, 2000).

Durante la etapa infantil, la adquisición progresiva de la postura erecta y la locomoción bípeda son responsables de importantes cambios morfoestructurales (Volpato, 2008). Por su morfología, preservación y temprano desarrollo el ilion es el elemento que mayor atención ha recibido respecto de la manifestación de dimorfismo sexual en etapas tempranas de la ontogenia (García Mancuso *et al.*, 2018).

Sobre las hormonas sexuales y su impacto en diferentes momentos del desarrollo

Aunque el sexo genético queda determinado en el momento de la fecundación, las características fenotípicas macroscópicas solo serán observables a la 7ma semana del desarrollo embrionario (Gómez Dumm, 2003). En términos generales, las gónadas pasan por un estadio indiferenciado en el que las gametas migran hacia los primordios gonadales (Fig. 2), luego se diferencian los cordones que definirán la estructura de las gónadas diferenciadas y el sistema de conductos; más tarde se diferenciarán los genitales externos y, en la pubertad, ocurre el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y el alcance de la madurez sexual.

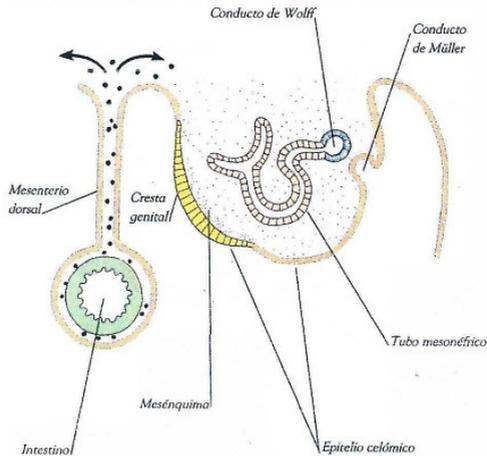


Figura 2. Corte transversal de la cresta urogenital a la 5ta semana. Las flechas indican el movimiento de los gonocitos hacia la cresta genital. (reproducido de Gómez Dumm, 2003).

En la pubertad ocurre la activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la

maduración de la función reproductiva. La GnRH hipotalámica estimula la secreción de FSH y LH en hipófisis anterior, que estimulan a las gónadas (ovarios y testículos) para la producción de gametas (ovocitos y espermatozoides) y de hormonas sexuales. Estas hormonas se liberan a la sangre y llegan a todo el organismo donde tienen múltiples efectos sobre el aparato reproductor e inducen el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios que son los principales responsables del dimorfismo sexual de nuestra especie.

Actualmente, a su vez, se reconocen otros dos períodos de activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, uno durante el período fetal, que coincide con los primeros estadios de diferenciación de folículos y túbulos seminíferos, y otro en los primeros 3-6 meses de vida (Lanciotti *et al.*, 2018).

Dado que las hormonas esteroideas atraviesan la barrera placentaria, las hormonas maternas influyen en el proceso de desarrollo. Es por este motivo que el fenotipo femenino es considerado el fenotipo basal, pero en cambio, el fenotipo masculino solo se diferencia con presencia del gen *Sry* (factor de determinación testicular) y de sustancias producidas por los testículos, específicamente por sus células de Leydig y de Sertoli (Carlson, 2019). La secreción de testosterona por las células de Leydig alcanza un pico de concentración entre las semanas 11 y 14 de gestación que conducirá a la masculinización de los genitales. Luego, entre 1 y 3 meses después del nacimiento, hay otro pico de testosterona que inmediatamente declina y se mantiene bajo hasta el empuje puberal; este evento se conoce como mini-pubertad y parece ser fundamental en el desarrollo de los órganos reproductores masculinos aunque no está tan claro cuál es el impacto en la función reproductiva en niñas (Lanciotti *et al.*, 2018).

Sobre la base de esta información, la presente investigación propone conocer si es posible determinar el sexo a partir de del análisis de indicadores morfológicos y morfométricos presentes en restos esqueléticos de individuos fetales e infantiles.

Hipótesis

H0: las diferencias morfológicas en el esqueleto se desarrollan como caracteres sexuales secundarios por lo cual no es posible encontrar diferencias en individuos que aún no atravesaron la pubertad.

H1: dado que existe secreción de hormonas sexuales desde etapas tempranas del desarrollo, es posible que se observe dimorfismo sexual en el esqueleto de individuos fetales e infantiles.

Objetivos

Objetivo general

Definir la factibilidad de determinar sexo en restos óseos de individuos documentados en un rango de edad entre 20 semanas de gestación y 6 meses posteriores al nacimiento, con el propósito de aplicar dichas determinaciones a restos esqueléticos de individuos y/o poblaciones no documentadas.

Objetivos específicos

- Registrar variables métricas en ilion de esqueletos inmaduros.
- Analizar el grado de confiabilidad dichas variables como estimadores dimórficos.

Materiales y métodos

La muestra analizada pertenece a la Colección Osteológica Prof. Dr. Rómulo Lambre que se encuentra depositada en la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

La Colección Lambre es una colección osteológica documentada, y cuenta con información de sexo, edad y fecha de fallecimiento de cada uno de los esqueletos que la conforman, lo que permite realizar investigaciones que integren las características esqueléticas con información referente a los individuos en vida (Plischuk *et al.*, 2020). La Colección Lambre comenzó su constitución hacia 2005 a partir de

acuerdos periódicos (2005, 2012) entre la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), la Facultad de Ciencias Naturales y el Museo (FCNyM) y el Cementerio Municipal La Plata (CMLP). Los restos que se encuentran depositados en la colección pertenecen a cadáveres no reclamados por familiares cuyo destino era la disposición final en osario común y son cedidos por el CMLP a la FCM, con el objetivo de utilizarlos en tareas de investigación y enseñanza (Ordenanza Municipal 9471/02) (Plischuk *et al.*, 2020; Salceda *et al.*, 2012).

Los estándares referidos al manejo de estos restos fueron evaluados por el Comité de Bioética de la FCM, UNLP (COBIMED Exp. 800-6213812/12), considerando a su vez la “Declaración de la Asociación de Antropología Biológica Argentina en Relación con la Ética del Estudio de Restos Humanos” (AABA, 2007) y el “Código Deontológico para el estudio, conservación y gestión de restos humanos de poblaciones del pasado” (Aranda, Barrientos y Del Papa, 2014), y se garantizó un trato digno y respetuoso a los restos a través de un correcto manejo y preservación (García- Mancuso *et al.*, 2019). Sobre un total de 157 individuos subadultos se seleccionó una muestra de restos óseos de fetos e infantes. Fueron excluidos aquellos que no contaban con información documental asociada, aquellos cuyos restos se encontraban extremadamente incompletos y/o deteriorados y también los que tenían evidencia de patologías notables sobre esqueleto o dientes.

Se tomó la decisión metodológica de estandarizar la edad en semanas de gestación. Esta estandarización de edad cronológica parte de definir *a priori* dos conceptos básicos: a) concebir al año calendario como equivalente a 52 semanas y b) establecer como fecha de nacimiento a la semana 40 de la gestación (Fig. 3).

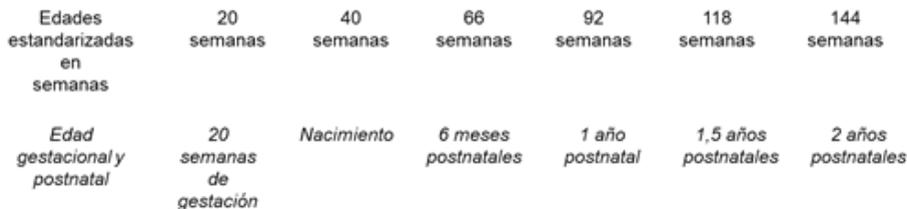


Figura 3. Comparación de edades estandarizadas en semanas utilizadas en este trabajo y edades cronológicas convencionales.

Dado que los individuos fetales no cuentan con edad cronológica documentada se decidió definir la edad como promedio de las edades estimadas a partir de la longitud de los huesos largos calculadas sobre los modelos de regresión construidos a partir de las referencias de Fazekas y Kósa (1978) para individuos fetales y las de Maresch (1970) para postnatales. La edad constituye la variable dependiente a ser estimada (en semanas) por la variable independiente Longitud (expresada en milímetros). Para húmero, radio, ulna, fémur o tibia la edad se calcula como $Edad = cte \times e^{(b1 \cdot Longitud)}$. Para la estimación de la edad a partir de la longitud diafisaria de fíbula $Edad = cte + b1 * Longitud + b2 * Longitud^2$. Los coeficientes de regresión cte, b1 y b2 son parámetros estimados de los datos de las referencias que se encuentran resumidos en la Tabla 1. El número e es una constante matemática ($e: 2,718281828...$) (García- Mancuso, 2013).

Variable dependiente: Edad en semanas		Resumen del modelo	Parámetros estimados		
Variable independiente:	Ecuación	R ²	Constante	b1	b2
Longitud de Húmero	Exponencial	,987	11,782	,019	~
Longitud de Radio	Exponencial	,957	8,314	,029	~
Longitud de Ulna	Exponencial	,981	9,324	,025	~
Longitud de Fémur	Exponencial	,982	15,570	,013	~

Longitud de Tibia	Exponencial	,981	13,369	,017	~
Longitud de Fibula	Cuadrática	,981	9,417	,167	,006

Tabla 1. Modelos de regresión para la estimación de la edad.

La muestra de trabajo quedó conformada por 60 individuos con información de sexo documentada y con edades estimadas en el período comprendido entre 27 y 61 semanas (Tabla 2). A su vez, la muestra fue dividida en dos grupos definidos como A y B. El grupo A incluye individuos fetales con edades de entre 27 y 40,9 semanas y el B individuos con edades postnatales de entre 41 y 61 semanas.

		Edad en semanas				
		Sexo	N	Media	Mínimo	Máximo
Grupos de edad	A	F	14	34,0	27,2	40,8
		M	19	35,7	29,6	40,8
	B	F	14	46,4	41,5	56,2
		M	13	48,3	41,6	61,0
Total	F	28	40,2	27,2	56,2	
	M	32	40,8	29,6	61,0	

Tabla 2. Composición de la muestra.

Para comprobar la existencia de diferencias dimórficas se analizó el hueso iliaco y su escotadura ciática (Fig. 4). En el hueso iliaco en general se relevaron la longitud y ancho de ilion según la técnica aconsejada por Fazekas y Kósa (1978) con un calibre digital Mitutoyo (precisión 0,01 mm). El análisis del área de la escotadura ciática se realizó sobre imágenes fotográficas a través de la utilización de un programa analizador de imágenes. Para ello se tomaron fotografías del ilion izquierdo en vista ventral, sólo en el caso en que éste no se encontrara o que estuviera muy deteriorado se tomó el derecho. La

toma de las imágenes fue estandarizada por el uso de una cámara Lumix de Panasonic con zoom óptico 6x, a 15 cm. de distancia sobre fondo negro, con una escala milimetrada que permitiera estandarizar el tamaño de las imágenes y las medidas relevadas sobre las mismas (González, 2008; Blake, 2011).

Sobre la imagen digital se relevó el área de la escotadura ciática mayor mediante la utilización del programa Image Pro-Plus 7 que ofrece herramientas de captura y análisis de imágenes. A través del uso de este programa se creó una escala para cada fotografía y se tomaron las medidas y ángulos descritos a continuación utilizando las herramientas correspondientes. Las medidas fueron almacenadas en una hoja de cálculo para su posterior análisis.

A partir de la combinación de las medidas amplitud y profundidad se calculó el índice de la escotadura utilizado por otros autores (Fazekas y Kósa, 1978; Boucher, 1957; Schutkowski, 1987) y se estimaron otros nuevos combinando la información aportada por las variables relevadas.

Rasgos métricos de hueso ilíaco relevados con calibre digital

Longitud: distancia medida entre las espinas superiores anterior y posterior (Fazekas y Kósa, 1978)

Ancho: distancia medida entre el punto medio de la curvatura de la cresta ilíaca y el límite del ilion que forma la unión acetabular (*Ibid.*).

Rasgos métricos de escotadura ciática mayor relevados sobre imágenes fotográficas

Amplitud: la mayor distancia entre el extremo anterior y posterior de la escotadura ciática (Vlak, Roksandic y Schillaci, 2008).

Profundidad: la mayor profundidad de la escotadura medida de manera perpendicular a la recta trazada en la medición de la amplitud (*Ibid.*).

Distancia: ubicación de la mayor profundidad (midiendo sobre la misma recta de la amplitud) la distancia desde la carilla auricular hacia el punto donde interseca con la mayor profundidad de la escotadura.

Ángulo: tomando como vértice el punto de la mayor profundidad sobre el borde de la escotadura y trazando las tangentes sobre los bordes anterior y posterior de la escotadura descriptores de la apertura del ángulo (*Ibíd.*).

Índices

Índice ilíaco: ancho / longitud (Schutkowski, 1987)

Índice de la escotadura: amplitud / profundidad (Boucher, 1957).

Índice D/P: distancia a la mayor profundidad / profundidad

Índice D/A: distancia a la mayor profundidad / amplitud

Índice D/ancho: distancia a la mayor profundidad / ancho ilíaco

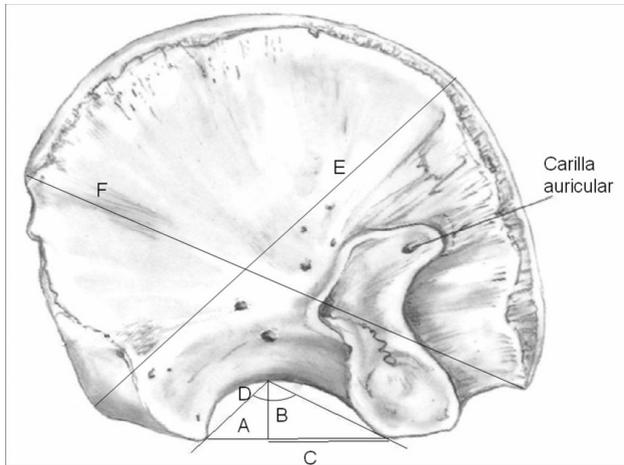


Figura 4. Ilion derecho en vista ventral con las medidas relevadas.

A: amplitud; B: profundidad; C: distancia; D: ángulo; E: ancho; F: longitud.

Con el objeto de conocer si existen diferencias dimórficas en las variables consideradas, se realizó la prueba de ANOVA de un factor (en este caso: sexo conocido) analizando las diferentes variables para la muestra agrupada y luego por grupos de edad.

Finalmente, se realizó un análisis discriminante para establecer cuales variables permiten diferenciar los sexos y cuantas de esas variables son necesarias para alcanzar una mejor estimación. El análisis discriminante es una técnica multivariada capaz de aprovechar las relaciones existentes entre un gran número de variables para maximizar la capacidad de discriminación entre dos o más grupos. Esta técnica ayuda a identificar las características que diferencian (discriminan) los grupos y a crear una función capaz de distinguirlos con la mayor precisión posible.

Para el análisis discriminante se utiliza una variable dependiente, que en este caso es el sexo, conocido a partir de la información documental que acompaña la muestra, y un conjunto de variables independientes o variables de clasificación que presenten diferencias significativas entre los grupos y que en este caso serán aquellas relevadas sobre el ilion y su escotadura ciática.

El propósito de este análisis es crear una función discriminante (D) con capacidad de diferenciar los grupos, logrando que los sujetos de un grupo consigan puntuaciones máximas, y los del otro, puntuaciones mínimas. Los puntos medios de cada grupo se denominan *centroides*.

Una ventaja de la función discriminante es que reduce la dimensionalidad de las variables independientes en una combinación lineal D, donde los grupos se diferencian al máximo. A partir de esta función se calculan las *puntuaciones discriminantes*, entendidas como aquellas puntuaciones que se asignan a los sujetos a partir de la función D y que permiten realizar la clasificación de los mismos.

Resultados

La prueba ANOVA de un factor (sexo) aplicada a toda la muestra no arrojó diferencias significativas para ninguna de las variables absolutas ni índices. Sin embargo, aplicada a grupos de edad A y B mostró diferencias significativas para *Índice iliaco* en el grupo A ($gl = 1$; $F = 4,408$; $P = 0,045$) y para cinco de las diez variables analizadas en el grupo B (Tabla 2).

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	P
Longitud de ilion	Entre grupos	45,832	1	45,832	5,257	,031*
	Dentro de grupos	209,223	24	8,718		
	Total	255,055	25			
Profundidad de la escotadura	Entre grupos	1,465	1	1,465	6,161	,020*
	Dentro de grupos	5,944	25	,238		
	Total	7,409	26			
Ángulo de la escotadura	Entre grupos	140,321	1	140,321	4,921	,036*
	Dentro de grupos	712,926	25	28,517		
	Total	853,248	26			
Índice de la escotadura	Entre grupos	1,830	1	1,830	8,498	,007*
	Dentro de grupos	5,383	25	,215		
	Total	7,213	26			
Índice D/P	Entre grupos	,714	1	,714	6,308	,019*
	Dentro de grupos	2,831	25	,113		
	Total	3,545	26			

* diferencias significativas

Tabla 2. Diferencias sexuales en variables ilion en el grupo B.

El análisis discriminante se realizó solo sobre los individuos pertenecientes al grupo B, ya que fue el grupo en el cual se encontraron mayor número de variables con diferencias significativas entre sexos: longitud del ilion, profundidad de la escotadura, ángulo de la escotadura ciática mayor y el índice de D/P.

Se utilizó el método de *inclusión por pasos* y se obtuvieron las puntuaciones discriminantes a partir del mismo. Finalmente, se aplicó el método de *validación cruzada* dejando uno afuera con el fin de comprobar la capacidad predictiva de la función. En la validación cruzada cada caso es clasificado a partir de la función calculada sobre todos los casos en análisis.

Se procesaron un total de 26 casos (uno fue excluido por presentar un valor perdido) quedando la muestra conformada por 13 individuos de sexo femenino y 13 de sexo masculino.

El método de inclusión por pasos introdujo sólo dos variables en el modelo, el *Índice de la escotadura* en el primer paso y la *Longitud del ilion* en el segundo. El resto de las variables no aportaron nueva información para la discriminación por lo que fueron excluidas.

Se obtuvo una correlación canónica (correlación entre las puntuaciones discriminantes y la variable dicotómica 'sexo') de 0,631 indicativa que las variables seleccionadas permiten diferenciar grupos. Además, los resultados del estadístico Lambda de Wilks: 0,601, y su valor transformado Chi-cuadrado: 12,205 (gl = 1; P = 0,002) permiten rechazar la hipótesis nula de que no existe dimorfismo sexual y que los sexos tienen promedios iguales para las variables discriminantes. Los coeficientes estandarizados (independientes de la métrica original de las variables analizadas) indican que la variable *Índice de la escotadura* tiene mayor importancia que la Longitud de ilion a la hora de predecir el sexo de un individuo.

La función discriminante para la estimación de sexo en la muestra analizada es: $-0,915 + 1,976 * \text{índice de la escotadura} - 0,227 * \text{longitud del ilion}$, donde las variables están relevadas en milímetros.

El punto de corte fue establecido como el punto equidistante entre los centroides para ambos grupos, con un valor de $-0,058$, correspondiendo las puntuaciones discriminantes de signo positivo al sexo femenino y las de signo negativo al sexo masculino (Fig. 5).

Los resultados de la validación cruzada indican que el sexo de los individuos fue correctamente clasificado en el 78% de los casos.

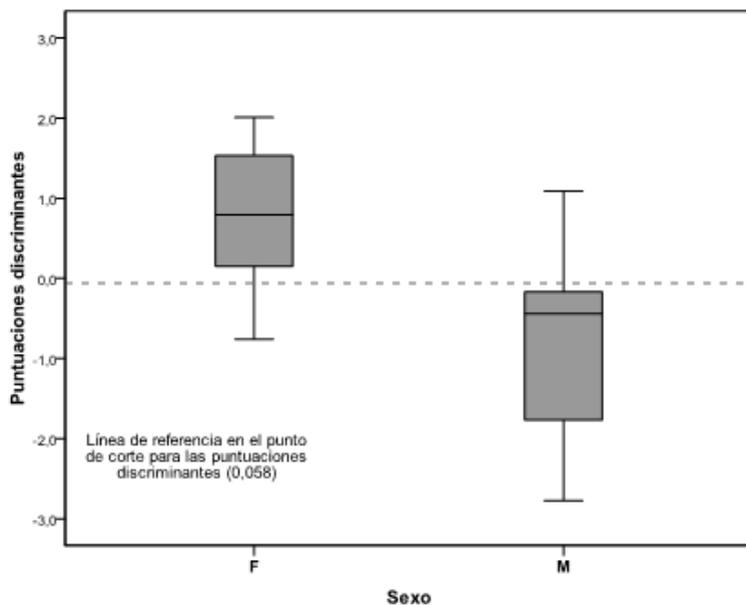


Figura 5. Distribución de las puntuaciones discriminantes por sexo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que existe dimorfismo sexual en el esqueleto desde etapas tempranas del desarrollo. A su vez, se corroboró que pueden hallarse diferencias estadísticamente significativas entre los sexos en variables métricas relevadas en ilion fetal e infantil, y que esas diferencias se hacen manifiestas

al final del período gestacional. Finalmente, este trabajo demuestra la importancia de la investigación sobre colecciones osteológicas de referencia para su potencial aplicación de sus resultados en muestras arqueológicas y casos forenses.

Referencias bibliográficas

- AABA. (2007). *Declaración de la Asociación de Antropología Biológica Argentina. Ética del estudio de restos humanos*. Disponible en: <https://asociacionantropologiabiologicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/sites/9/2019/12/Declaraci%C3%B3n-AABA-Restos-Humanos.pdf>.
- Aranda, C.; Barrientos, G.; Del Papa, M.C. (2014). Código deontológico para el estudio, conservación y gestión de restos humanos de poblaciones del pasado/ Code of ethics for the study, conservation and management of human remains of populations from the past. *Rev Arg Antrop Biol*, 16(2):111-113.
- Blake, K. (2011). *An investigation of the sex determination from subadult perlvvis: a morphometric analysis*. Tesis Doctoral, Faculty of Arts and Sciences, Department of Anthropology, University of Pittsburgh: Pittsburgh.
- Boucher, B. (1957). Sex differences in the foetal pelvis. *Am Jour Phys Anth*, 15(4):581-600.
- Brothwell, D.R. (1981). *Desenterrando huesos*. Madrid: Fondo de Cultura Económica.
- Buikstra, J.E.; Ubelaker, D.H. (1994). *Standards for data collection from human skeletal remains*. Arkansas: Arkansas Archeological Survey Research Series.
- Cameron, N. (2002). *Human growth and development*: Elsevier Science.
- Carlson, B.M. (2019). *Embriología Humana Y Biología del Desarrollo*: Elsevier Health Sciences.
- Fazekas, I.G.; Kósa, F. (1978). *Forensic foetal osteology*. Budapest: Akademiai Kiadó Publishers.

- García Mancuso, R.; Petrone, S.; Salceda, S.A.; González, P.N. (2018). Revisión crítica de la utilización del ilion para el diagnóstico de sexo en restos esqueléticos de individuos subadultos mediante técnicas morfométricas. *Anales de Antropología*, 52(2):7-22.
- García-Mancuso, R. (2013). *Análisis bioantropológico de restos esqueléticos de individuos subadultos. Diagnóstico de edad y sexo, validación técnico metodológica*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata: La Plata.
- García-Mancuso, R.; Plischuk, M.; Desántolo, B.; Garizoain, G.; Sardi, M.L. (2019). *Ethical Considerations in Human Remains Based Research in Argentina*. En Squires, K., Errickson, D., y Márquez-Grant, N. (Eds). *Ethical Approaches to Human Remains: A Global Challenge in Bioarchaeology and Forensic Anthropology* (pp. 447-463). Springer International Publishing: Cham.
- Gómez Dumm, C. (2003). *Embriología Humana*. Buenos Aires: Editorial El Ateneo.
- González, P.N. (2008). *Morfometría geométrica aplicada al análisis del dimorfismo sexual en restos óseos humanos de individuos adultos y subadultos*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata: La Plata.
- Huseynov, A.; Zollikofer, C.P.E.; Coudyzer, W.; Gascho, D.; Kellenberger, C.; Hinzpeter, R.; Ponce de León, M. S. (2016). Developmental evidence for obstetric adaptation of the human female pelvis. *PNAS*, 113(19): 5227-5232.
- Lanciotti, L.; Cofini, M.; Leonardi, A.; Penta, L.; Esposito, S. (2018). Up-To-Date Review About Minipuberty and Overview on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Activation in Fetal and Neonatal Life. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 410.
- Leakey, R. (2000). *El origen de la humanidad*. Madrid: Debate.
- Maresh, M.M. (1970). *Measurements from roentgenograms*. En McCammon, R.W., (Ed). *Human growth and development* (pp. 157-200). Charles Thomas: Springfield.

- Plischuk, M.; Garizoain, G.; Petrone, S.; García Mancuso, R.; Salceda, S.A.; Inda, A.M.; Desántolo, B. (2020). El aporte de las colecciones osteológicas documentadas: líneas de investigación en la Colección “Prof. Dr. Rómulo Lambre” (La Plata, Argentina). *Jangwa Pana*, 19(1):102-127.
- Salceda, S., Desántolo, B., García-Mancuso, R.; Plischuk, M.; Prat, G.M.; Inda, A.M. (2009). Integración y conservación de la Colección osteológica “Profesor Doctor Rómulo Lambre”: avances y problemáticas. *Rev Arg Antrop Biol*, 11(1):133-141.
- Salceda, S.A.; Desántolo, B.; García-Mancuso, R.; Plischuk, M.; Inda, A.M. (2012). The ‘Prof. Dr. Rómulo Lambre’ Collection: An Argentinian sample of modern skeletons. *HOMO*, 63(4): 275-281.
- Scheuer, L.; Black, S. (2000). *Developmental juvenile osteology*. Londres: Academic Press.
- Schutkowski, H. (1987). Sex determination of fetal and neonate skeletons by means of discriminant analysis. *Int Jour Anthropol*, 4(2): 347-352.
- Ubelaker, D.H. (2018). A history of forensic anthropology. *Am Jour Phys Anth*, 165(4): 915-923.
- Vlak, D., Roksandic, M.; Schillaci, M.A. (2008). Greater sciatic notch as a sex indicator in juveniles. *Am Jour Phys Anth*, 137:309-315.
- Volpato, V. (2008). Morphogenèse de l'endostructure osseuse de l'ilion humain. *Comptes Rendus Palevol*, 7(7): 463-471.
- White, T.D.; Black, M.T.; Folkens, P.A. (2012). *Human osteology*. California: Academic Press.

CICATRIZACIÓN Y REGENERACIÓN CELULAR

Propuesta de un nuevo tratamiento para lesiones dérmicas crónicas

García, Marcela N.¹

Introducción

Reparación tisular y células madre

La reparación tisular puede tener lugar mediante dos mecanismos diferentes:

1. Cicatrización: Es la reparación de una herida con tejido fibroso, mediante un proceso biológico complejo, resultado del movimiento, división y síntesis proteica celular. Genera un producto final de tejido no funcional denominado cicatriz.
2. Regeneración: Es el proceso de reparar tejidos u órganos dañados por tejido noble funcional. En este proceso se recupera la estructura y función de los tejidos u órganos dañados.

La medicina regenerativa o reparativa, que muchas veces se denomina también terapia celular, utiliza las “Células madre” (CM) para regenerar los tejidos.

Las CM, para ser consideradas como tal, deben presentar ciertas características:

¹ Profesora en la cátedra de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

- Diferenciación: la capacidad de convertirse en distintos tipos de células especializadas en diversas funciones.
- Auto-renovación: la capacidad de crear nuevas células madre.
- Proliferación: la capacidad de dividirse indefinidamente.

Según su origen las CM se clasifican en:

- Embrionarias: se obtienen a partir de la mórula (células totipotentes) o del macizo celular interno o embrioblasto del blastocisto (células pluripotentes).
- Adultas: son las que están alojadas en el organismo de recién nacidos, niños y adultos. Son más limitadas y especializadas que las embrionarias, inicialmente se las denominó multipotentes aunque hoy se consideran pluripotentes (Bargues *et al.*, 2011).

Dentro de las CM adultas tenemos 3 grandes grupos:

Las CM hematopoyéticas (CMH), que pueden obtenerse de la médula ósea y de sangre periférica o de los vasos sanguíneos del cordón umbilical. Son multipotentes, pueden generar todos los linajes sanguíneos. Al ser trasplantadas pueden reconstituir el sistema hematopoyético: Esta terapia ya está aprobada y se denomina “Trasplante de médula ósea”.

Las CM mesenquimales derivadas de pluripotentes (CMM-DP) o pluripotentes inducidas (CMPi o iPS por sus siglas en inglés), son CM obtenidas en el laboratorio celular a partir de una célula no pluripotente, por ejemplo un fibroblasto, mediante un proceso de desdiferenciación. Solo pueden ser utilizadas para investigación ya que para su obtención se les incorpora un virus (Luzzani *et al.*, 2015).

Finalmente, las CM mesenquimales (CMM), quienes tienen la capacidad de reparar, restablecer, reemplazar y regenerar células y tejidos. Son las CM utilizadas en medicina regenerativa.

Células madre mesenquimales (CMM)

Las CMM se obtienen habitualmente de tres fuentes principales: la médula ósea (el primer sitio utilizado), el tejido adiposo (mediante un procedimiento de liposucción) y la gelatina de Wharton del cordón umbilical (CMMcu).

Para la caracterización de las CMM se consideran varias cualidades:

- Más del 95% de la población celular debe expresar los antígenos específicos de superficie o CD (cluster of differentiation en inglés): CD105, CD73 y CD90, pero no deben expresar: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.
- Deben adherirse al plástico cuando se mantienen en condiciones normales de cultivo.
- Deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándares de diferenciación *in vitro*. Por trans-diferenciación pueden originar otros tipos celulares, como células epiteliales de diferente origen embriológico (enterocitos) e incluso a neuronas. (Araujo Farias *et al.*, 2018; Dylan *et al.*, 2016; Linard *et al.*, 2018).

Células madre mesenquimales derivadas de codón umbilical (CMMcu)

Las CMMcu se identifican por la expresión conjunta de CD90+, CD73+, CD105+, CD166+, CD172alfa+, CD171+ y la ausencia de CD11b-, CD14-, CD19-, CD34-, CD45-, CD79a, CD309-. Su utilización clínica no presenta las objeciones éticas de las CM embrionarias al provenir de cordones umbilicales que habitualmente son descartados en los partos, por lo que son fácilmente obtenidas sin el trauma que involucra el método de obtención de CMM a partir de la médula ósea o a partir de una liposucción. Además, en bajos pasajes no son tumorigénicas. Son la población de CMM con mayor capacidad de inmunomodulación local gracias a la expresión de puntos de control inmunitarios o Inmuno-checkpoints, en particular el HLA-G (Dah-

Ching Ding *et al.*, 2015, Naji *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2020, Palma *et al.*, 2021).

El HLA-G es una molécula HLA (Human Leukocyte Antigen) también denominado complejo mayor de histocompatibilidad tipo I no clásico G. Los HLA clásicos son diferentes para cada individuo y son los responsables del rechazo en los trasplantes de órganos. El HLA-G es expresado naturalmente por las células del trofoblasto para la inducción de la tolerancia materno-fetal durante el embarazo. Es un importante inmuno-checkpoint, modulador de la respuesta inmune local. Para ejercer su acción puede unirse a varios receptores de membrana, aunque los dos principales son el ILT2 y el ILT4. El ILT2 se encuentra en la superficie de la mayoría de las células inmunes (monocitos/macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, una sub-población de los linfocitos T y células NK) y el ILT4 se presenta en neutrófilos y células mieloides. Estos receptores se encuentran, entonces, en la casi totalidad de las células inmunes, produciendo una inhibición generalizada en la respuesta inmune local (Carosella *et al.*, 2008 y 2015; Selmani *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2015).

Presentación de un desafío problema: Encontrar una solución efectiva para la resolución de las úlceras venosas crónicas (UVC).

Objetivos

Objetivo general

Obtener un tratamiento para la regeneración de los tejidos involucrados en las UVC resistentes a los tratamientos convencionales.

Objetivo específico

Desarrollar una línea celular (obtenida de CMMcu), que pueda ser utilizada alogenicamente para la regeneración de los tejidos dañados y recuperación de las funciones de la piel.

Hipótesis de trabajo

La aplicación alogénica de esta línea celular en la UVC resistente inducirá la regeneración de los tejidos dañados, sin que ocurran fenómenos inmunológicos de rechazo celular.

¿Qué es una UVC?

Es la pérdida de tejido que se produce en forma accidental o espontánea y que no cicatriza en un periodo de 15 días luego de corregido el factor externo que la produjo. Generalmente la causa inicial es una insuficiencia venosa crónica, que lleva a la hipertensión venosa, con trastornos tróficos y edema, que termina con la formación de una lesión dérmica ulcerativa o UVC. Es una de las complicaciones más comunes en la diabetes aunque también puede ser generada por factores adquiridos tales como sedentarismo y obesidad (Eming *et al.*, 2017; Bonkemeyer *et al.*, 2019; Meulendjiks *et al.*, 2019). Imagen I.



Imagen I: fotografías tomadas de dos pacientes con UVC en sus miembros inferiores.

Actualmente existen varios tratamientos aprobados para su curación, como los vendajes elastocompresivos, la bota de Unna, el injerto de piel, los apósitos hidrocoloides y la cirugía de várices. Sin embargo, ninguno ha demostrado una alta eficacia. A partir del análisis de la zona lesionada hemos observado que la causa de la falla de estos tratamientos es la falta de vitalidad del tejido circundante, por lo que

consideramos que la mejor respuesta a este tipo de problemas es la Medicina regenerativa o terapia celular. De hecho, varias publicaciones previas han mostrado la utilización de CMM autólogas (o sea obtenidas del propio individuo) de médula ósea y de tejido adiposo para el tratamiento de estas lesiones. Los resultados obtenidos han sido satisfactorios, sin embargo, existen ciertas limitaciones como el tiempo que lleva obtener un gran número de células, los métodos traumáticos de extracción y las complicaciones asociadas (riesgo asociado de infección por ejemplo) (Bargues *et al.*, 2011; Araújo Farias *et al.*, 2018; Dylan *et al.*, 2016; Linard *et al.*, 2018; Masłowski *et al.*, 2020).

Todos estos antecedentes nos llevaron a desarrollar una línea celular (estable y segura), derivada de CMMcu, para el tratamiento de lesiones dérmicas crónicas (ulcerativas) mediante un procedimiento de trasplante alogénico: a esta población la denominamos células mesenquimales derivadas (CMD).

Materiales y Métodos

Obtención y caracterización de las CMD

Las CMM son aisladas de la gelatina de Wharton de cordones umbilicales humanos, descartados luego de los partos. Estos cordones son transportados para su procesamiento en el laboratorio de cultivo celular. Allí son cortados en pequeños fragmentos y colocados sobre una placa de cultivo. Las células comienzan a crecer a partir del 10mo día.

La caracterización de las CMD se realiza mediante la técnica de citometría de flujo para la marcación de antígenos de superficie (CD44+, CD73+, CD29+, CD105+, CD90+, HLA-G+, HLA-DR-). Gráfico I.

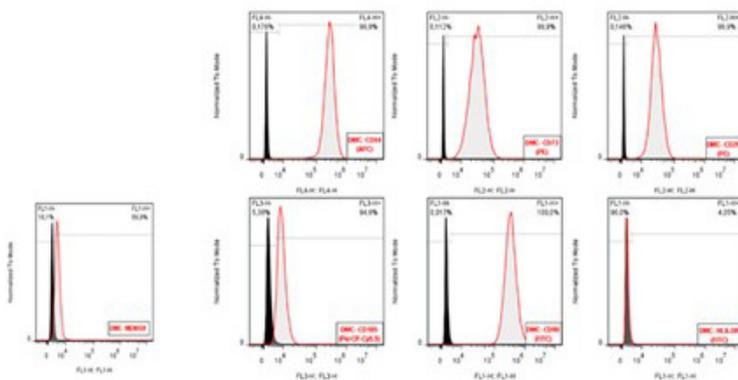


Gráfico I: Las células dieron positivo para CD44, CD73, CD29, CD105, CD90 y HLA-G y negativo para HLA-DR-.

Luego se realiza el ensayo de multipotencia para confirmar el potencial de diferenciación celular de las CMD a los 3 linajes característicos. Se utilizó el kit de adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis StemPro (Life Technologies). Imagen II.



Imagen II: al M/O se observan los tres linajes obtenidos: a-adiposo, b-cartilaginoso y c-óseo.

Se realiza también el análisis de las CMMcu cultivadas mediante RT-PCR para confirmar la expresión del HLA-G (expresión indispensable para su utilización alogénica). Los cebadores específicos que se utilizaron detectan todas las isoformas conocidas de HLA-G: 257 Fw/ 526 Rv (Tronik-Le Roux *et al.*, 2017). Gráfico II.

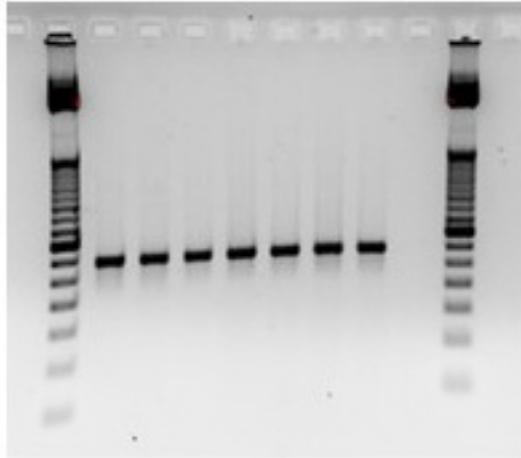
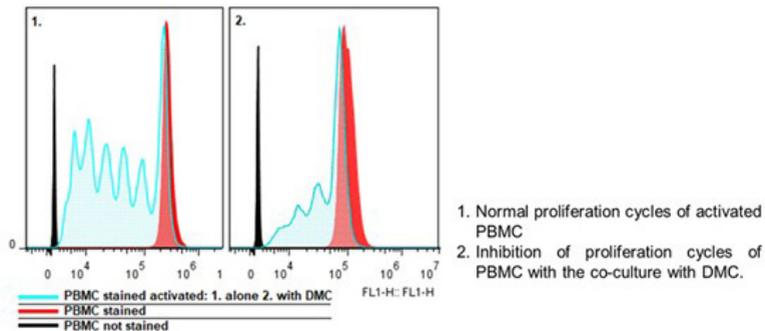


Gráfico II: RT-PCR de DMC aisladas de 7 cordones umbilicales. Se observan las bandas correspondientes a la expresión de HLA-G. Primers 257Fw/526Rv.

Resultados

Test de capacidad de inmunomodulación

Para esto, se evalúa la inhibición de la proliferación de linfocitos ex vivo. Se realiza el co-cultivo de las PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*, por sus siglas en inglés), principalmente linfocitos y monocitos de sangre periférica, con las DMC. Los ciclos celulares de proliferación de los linfocitos son analizados mediante citometría de flujo y se observó que la presencia de las CMD inhibe la proliferación de los linfocitos activados, confirmando su efecto inmunosupresor.



1. Normal proliferation cycles of activated PBMC
2. Inhibition of proliferation cycles of PBMC with the co-culture with DMC.

Modelo de estudio pre-clínico in vivo, en ratones

En este experimento se evalúa el efecto de las CMD en la cicatrización de heridas cutáneas en ratones inmunocompetentes. Las lesiones dérmicas se realizaron siguiendo el modelo (modificado) de d'Alessio (2014). El ensayo fue aprobado por el CICUAL de la FCM. Se utilizaron 18 ratones de la cepa C3H/s divididos en 3 grupos de 6 animales cada uno:

- Grupo 1: es el grupo control, sin aplicación de tratamiento.
- Grupo 2: son inyectados con CMMcu obtenidas de cordones umbilicales murinos (dosis de 250.000 CMMcu murinas/0,1 ml de PBS).
- Grupo 3: inyectados con las CMD humanas (dosis de 250.000 CMMcu humanas/0.1 ml de PBS).

En los grupos 2 y 3 las células se administraron mediante inyección intradérmica en los bordes de la lesión.

Para la evaluación histopatológica de la evolución de la herida, se tomaron muestras (con margen de piel no lesionada) a los 5 días posteriores al tratamiento.

Las muestras fueron procesadas mediante la técnica de rutina para tinción con hematoxilina y eosina (H/E), tricromico de Gomori para la observación de fibras colágenas y finalmente se realizó un test de inmunohistoquímica (IHQ) para medir la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), principal inductor de la neo-angiogénesis.

Los resultados obtenidos en los distintos grupos analizados mostraron:

- Grupo 1 (control) cicatrizó en $12 \pm 1,03$ días y la pilosidad se recuperó en $25 \pm 1,13$ días.
- Grupo 2 (CMM murinas) cicatrizó en $9 \pm 0,75$ días y la pilosidad se recuperó en $20 \pm 1,02$ días.

- Grupo 3 (CMD) cicatrizó en $5 \pm 0,81$ días y la pilosidad se recuperó en $10 \pm 0,90$ días.

Los valores de tiempo observados entre el grupo 1 y 3 (controles vs tratados con DMC) fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$) lo que significa que las células mejoran significativamente los tiempos de cierre de la herida.

En el análisis microscópico de las muestras obtenidas en el grupo 3 (inyectados con las CMD) a los 5 días del tratamiento se observó:

- Con H/E las secciones mostraron el aspecto desordenado típico del tejido en regeneración y la formación del tejido de granulación para la curación. En los cortes no se observan cantidades importantes de linfocitos u otras células inmunes infiltradas en el área.
- Con el tricrómico de Gomori se observó una formación normal de las fibras colágenas.
- IHQ (Ac VEGF-A): Se observa un intenso marcado positivo en las células del tejido conectivo, especialmente en los fibroblastos dispersos alrededor del tejido de granulación.

Conclusiones del ensayo en ratones

La población de CMD (y de CMMcu murinas) pueden ser trasplantadas en forma xenogénica (o alogénica) en ratones inmunocompetentes. La población de CMD no agregó procesos inflamatorios o inmunológicos significativos asociados al tejido de granulación, resultando en una reducción del 50 % en el tiempo de regeneración de los tejidos involucrados en las lesiones. Las DMC tienen la capacidad de liberar diversos factores de crecimiento, entre los que contamos al VEGF, ejerciendo un efecto paracrino en la zona y activando los procesos de regeneración en los tejidos adyacentes.

Una observación importante del ensayo en ratones fue que el grupo de los inyectados con las CMD (grupo 3) tuvo un proceso de curación incluso más rápido que el del grupo inyectado con las CMMcu murinas (grupo 2). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la

población de CMD inyectada es muy homogénea ya que está bien caracterizada, mientras que la población de CMM murinas no es posible de realizar una caracterización tan clara y posiblemente coexistan otros diferentes linajes celulares. Además, es importante mencionar que el ratón tiene un equivalente funcional y estructural al HLA-G, llamado Qa2 y sus células mieloides y linfocitos B presentan el receptor murino PIR-B (equivalente al ILT4), resultando de la interacción la activación y diferenciación de las células T reguladoras y supresoras (Palma *et al.*, 2021).



Imagen III: fotografías tomadas a los 7 días de tratamiento. De izquierda a derecha: grupos control, grupo 2 (CMM murinas) y grupo 3 (CMD).

Conclusiones finales

Proponemos un nuevo método para el tratamiento de las lesiones dérmicas ulcerativas crónicas, mediante la aplicación alogénica de una subpoblación estable y específica de células derivadas a partir de CM-Mcu humanas: las CMD.

Estos resultados permitieron la inscripción de una patente en la Oficina Europea de Patentes, denominada: “*Cells differentiated from mesenchymal stem cells for the treatment of dermal lesions*”. Autores: Marcela García; Guillermo Buero; Edgardo D. Carosella. Este es un desarrollo conjunto de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, el CEA (Comisariado de la Energía Atómica) y la Universidad Sorbona VII de Paris, Francia.

Referencias bibliográficas

- Araújo Farias, V.; Carrillo-Gálvez, A.B.; Martín, F.; Anderson, P. (2018). 3-TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. Cytokine. Review. *Growth Factor Rev.* 43:25-37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.06.002. 2018.
- Bargues, L.; Prat, M.; Leclerc, B. E.; Lataillade, J.J. (2011). Present and future of cell therapy in burns. *Pathol Biol.* 59. e49–e56. 2011.
- Bonkemeyer Millan S.; Gan, R.; Townsend, P.E. (2019). Venous Ulcers: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2019 Sep 1;100 (5):298-305.
- Carosella, E.D.; Moreau, P.; LeMaoult, J.; Rouas-Freiss, N. (2008). HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in Immunology*, Vol 29 (3): 125-132. 2008.
- Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Tronik-Le Roux, D.; Moreau, P.; LeMaoult, J. (2015). HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Advances in immunology*, 127: 33-144. 2015.
- Dah-Ching Ding; Hsiang-LanChou; Yu-Hsun Chang; Wei-Ting Hung; Hwan-Wun Liu andTang-Yuan Chu. (2015). Characterization of HLA-G and related immunosuppressive effects in human umbilical cord stroma derived stem cells. DOI: 10.3727/096368915X688182 CT-1292.
- D’Alessio, P.A.; Mirshahi, M.; Bisson, J.F.; Bene, M.C. (2014). Skin repair properties of d-Limonene and perillyl alcohol in murine models. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2014; 13(1):29-3

- Daley G. (2012). The Promise and Perils of Stem Cell Therapeutics. *Cell Stem Cell*. Vol 10, (6): 740-49. 2012.
- Eming, S.A.; Wynn, T.A.; Martin, P. (2017). Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*. 2017 9; 356 (6342):1026-1030. doi: 10.1126/science. aam7928.
- Lee, D.E.; Ayoub, N.; Agrawal, D.K. (2016). Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Research and Therapy*. Vol 7,1,9. 2016.
- Linard, C.; Brachet, M.; Strup-Perrot, C.; L'homme, B.; Busson, E.; Squiban, C.; Holler, V.; Bonneau, M.; Lataillade, J-J.; Bey, E.; Benderitter, M. (2018). Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improve the Quality and Stability of Vascularized Flap Surgery of Irradiated Skin in Pigs. *Stem Cells Transl Med*. 7: 569-82. 2018.
- Luzzani, C.; Neiman, G.; Garate, X.; Questa, M.; Solari, C.; García, M.; Errecalde, A.; Guberman, A.; Scassa, M.; Sevlever, G.; Romorini, L.; Miriuka, S. A. (2015). Therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement. *Stem Cell Research and Therapy*. <http://stemcellres.com/content/6/1/6>. 2015.
- Maslowski, L.; Paprocka, M.; Czyżewska-Buczyńska, A.; Bielawska-Pohl, A.; Duś, D. Grendziak, R.; Witkiewicz, W.; Czarnecka, A. (2020). Autotransplantation of the Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Therapy of Venous Stasis Ulcers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2020 Feb 14;68(1):5. doi: 10.1007/s00005-020-00571-9.
- Meulendijks, A.M.; Franssen, W.M.A.; Schoonhoven, L.; Neumann, H.A.M. (2019). A scoping review on Chronic Venous Disease and the development of a Venous Leg Ulcer: The role of obesity and mobility. *J Tissue Viability*. 2019 Oct 9. pii: S0965-206X (19)30084-1. doi: 10.1016/j.jtv.2019.10.002.
- Naji, A.; Rouas-Freiss, N.; Durrbach, A.; Carosella, E.; Sensebe, L.; Deschaseaux, F. (2013). Concise Review: Combining Human Leu-

- kocyte Antigen G and Mesenchymal Stem Cells for Immunosuppressant Biotherapy. *Stem Cells*. 31:2296–2303. 2013.
- Palma, M.B.; Luzzani, C.; Andrini, L.; Riccillo, F.; Buero, G.; Pelinski, P.; Inda, A.M.; Errecalde, A.; Miriuka, S.; Carosella, E.; García, M. (2021). Wound healing by allogeneic transplantation of specific subpopulation from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*. <https://doi.org/10.1177%2F0963689721993774>. 2021.
- Selmani, Z.; Naji, A.; Gaiffe, E.; Obert, L.; Tiberghien, P.; Rouas-Freiss, N.; Carosella, E.D.; Deschaseaux, F. (2009). HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 87(9 Suppl): S62-6. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a2a4b3. 2009.
- Tronik-Le Roux, D.; Renard, J.; Vérine, J.; Renault, V.; Tubacher, E.; LeMaoult, J.; Rouas-Freiss, N.; Deleuze, J.F.; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.D. (2017). Novel landscape of HLA-G isoforms expressed in clear cell renal cell carcinoma patients. *Mol Oncol*; 11(11):1561-1578. doi: 10.1002/1878-0261.12119. 2017.
- Wu, C.; Svendsen, S.; Riviere, A.; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.; Lemaoult, J. (2016). Multiplex bead-based immunoassay for the free soluble forms of the HLA-G receptors, ILT2 and ILT4. *Hum Immunol*. 10.1016/j.humimm. 2016.
- Zhang, F.; Zheng, J.; Kang, X.; Deng, M.; Lu, Z.; Kim, J.; Zhang, C. (2015). Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in cancer development. *Sci China Life Sci*. 58 (12):1216-25. DOI: 10.1007/s11427-015-4925-1. 2015.
- Zhang, S.; Chen, L.; Zhang, G.; Zhang, B. (2020). Umbilical cord-matrix stem cells induce the functional restoration of vascular endothelial cells and enhance skin wound healing in diabetic mice via the polarized macrophages. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Jan 28;11(1):39.

INMUNOEVASIÓN Y CÁNCER DE MAMA

Isla Larrain, Marina Teresita¹

Introducción

El sistema inmune posee mecanismos efectores y supresores para ejercer sus funciones, entre ellas, la eliminación de células tumorales. Se ha sugerido que la enzima indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) tiene un papel en la supervivencia del tumor y restringe la inmunovigilancia del huésped al bloquear la respuesta inicial a los antígenos tumorales. IDO es una enzima de 42-45 kD que cataliza el paso limitante de la degradación del triptófano (Trp) a lo largo de la ruta de la quinureína. Se expresa en una variedad de células y tejidos (Mellor y Munn, 1999; Munn *et al.*, 1999; Taylor y Feng, 1991) y se describió originalmente en la placenta como contribuyente a la tolerancia materna hacia el feto (Munn y Mellor, 2007). IDO también se ha implicado en los mecanismos de protección contra el rechazo a injertos y en los tratamientos de trastornos autoinmunes (Jaspersen *et al.*, 2009). Esta enzima pue-

¹ Bioquímica y Doctora de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora de Biología e Introducción a la Biología Molecular y de Ambiente y Nutrición de la Licenciatura en Nutrición en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Investigadora Adjunta de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA-UNLP-CICPBA).

de estar relacionada con la regulación inmune a través de cambios metabólicos en el microambiente tumoral, y estos cambios locales pueden tener un impacto final en el desarrollo de la tolerancia periférica. La liberación de quinureína y el consumo de triptofano (Trp) por las células tumorales que expresanIDO generan señales a través del receptor de arilhidrocarburos (AhR) y los sensores de aminoácidos (GCN2, mTOR), respectivamente, que tienen efectos marcados en las respuestas de los linfocitos T efectores y T regulatorios (Treg) a las señales inflamatorias y antigénicas. La actividad deIDO en las células presentadoras de antígenos (CPA) también mejora la diferenciación de Treg a partir de linfocitos TCD4⁺ vírgenes a través de estas vías metabólicas. GCN2 parece mejorar la actividad de Treg e inhibir los linfocitos T efectores (Munn y Mellor, 2013). La sobreexpresión deIDO en células tumorales origina un déficit de Trp; las células T en la fase G1 son muy sensibles a la disminución de este aminoácido. En consecuencia, las células T no pueden proliferar eficazmente a través de la expansión clonal. Además, la proliferación de células T es difícil de reactivar una vez que se inhibe (Bauer *et al.*, 2005).

Las células “Natural Killer” (NK) son un componente importante de la inmunidad innata que puede eliminar las células transformadas y se ha informado que el mal funcionamiento y el número significativamente reducido de células NK contribuyen a la inmunevasión de las células tumorales en pacientes con cáncer (Raulet, 2004; Bauernhofer *et al.*, 2011). Song *et al.* (2011) descubrieron que la l-quinureína, catabolito del Trp en la reacción catalizada porIDO, induce la apoptosis a través de la generación de especies reactivas de oxígeno en las células NK humanas.

Por otra parte, los tumores malignos liberan exosomas o microvesículas que estaban relacionados con mecanismos tolerogénicos que promueven la evasión inmune (Whiteside, 2005). Entre estas microvesículas, se estima que los exosomas tienen un diámetro de 50 a 100 nm y se han relacionado con la progresión del cáncer, fundamental-

mente, debido a su abundancia en los fluidos corporales de pacientes que padecen cáncer en estadios avanzados.

La presente investigación se realizó considerando la hipótesis de que la expresión de IDO en los tumores está implicada en la tolerancia inmune. Para tal fin, se estudió, la expresión IDO en muestras tisulares de pacientes con cáncer de mama de diferentes tipos y en distintos estadios tumorales, en MV circulantes aisladas de sangre periférica y en líneas celulares de cáncer de mama. La expresión de IDO también se evaluó en muestras de tejido benigno y normal. Finalmente, se realizó un análisis *in silico* para determinar los genes coexpresados con IDO 1 y su asociación con procesos celulares.

Objetivos

1. Determinar la presencia de IDO en muestras procedentes de carcinoma de mama, tales como tejido tumoral y exosomas circulantes como así también en líneas celulares de cáncer de mama.
2. Comparar la expresión de IDO en muestras tumorales malignas *versus* benignas y normales.

Materiales/Pacientes y Métodos

Se analizaron 122 muestras de tejido y suero de 91 pacientes con cáncer de mama, 21 pacientes con enfermedades benignas y 10 controles normales derivados de muestras procedentes de mamoplastía. La distribución del tipo de cáncer de mama fue: 84% de carcinoma ductal invasor (CDI), 9% de carcinoma lobulillar invasor (CLI) y 7% de otros tipos. La estadificación patológica se estableció de acuerdo con el sistema de clasificación UICC TNM: 34%, 40%, 26% correspondientes a las etapas I, II y III, respectivamente. Receptores: el 78% de las muestras fueron positivas para el receptor de estrógenos (RE), el 71% para el receptor de progesterona (RP) y el 18% para HER2-neu.

Se obtuvieron muestras y datos clínicos de hospitales relacionados con la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de

La Plata, Argentina. Los procedimientos siguieron la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki (Finlandia, 1964) y otras modificaciones.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en este estudio. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Bioética Médica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Anticuerpo monoclonal: Se utilizó anticuerpo monoclonal anti-IDO (Millipore).

Inmunohistoquímica (IHQ): Se utilizó una técnica estándar de inmunoperoxidasa con recuperación antigénica con buffer citrato sódico pH 6,0.

Cultivo celular: Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo con medio RPMI 1640 y las células se sembraron en cubreobjetos, posteriormente se fijaron con formol al 10% en PBS.

Inmunocitoquímica (ICQ): Se adaptó la técnica de inmunoperoxidasa sin recuperación antigénica para observar la reacción de las células crecidas en cubreobjetos.

Aislamiento de microvesículas o exosomas: Seis mililitros de plasma de pacientes con cáncer de mama y líquido ascítico tumoral (control positivo) se centrifugaron a 15.000 xg durante 30 minutos a 4 ° C, los sobrenadantes fueron sometidos a cromatografía de exclusión molecular en columnas con gel de agarosa CL2B y el volumen muerto se ultracentrifugó a 105.000 xg durante 2 horas a 4 ° C. El pellet (fracción enriquecida en exosomas) se lavó y se diluyó en PBS.

SDS-PAGE y Western Blot: La electroforesis se realizó en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida al 15%. Se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con 5% de leche descremada/PBS. Se incubó con anticuerpo monoclonal anti-IDO durante 1 h. La reacción fue revelada mediante quimioluminiscencia.

Resultados

Expresión de IDO en muestras de cáncer de mama y muestras de enfermedad benigna por IHQ

Se estudiaron 122 muestras de mama: el 60% de cáncer de mama, el 43% de enfermedades benignas y el 20% de los controles normales mostraron expresión de IDO. La tabla 1 muestra los resultados expresados como porcentajes de muestras positivas/totales según el diagnóstico y, en las muestras de del cáncer de mama, según los estadios tumorales. Mediante el análisis χ^2 , se encontraron diferencias entre los grupos, siendo mayor la expresión de IDO en muestras de cáncer de mama ($p < 0.05$) (Figura 1A) con una correlación positiva de Kendall ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas entre muestras de cáncer de mama y muestras normales ($p < 0.05$). Además, la intensidad de la reacción fue significativamente mayor en muestras de cáncer que en muestras benignas y normales (prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.05$).

El porcentaje de muestras positivas aumentó en función del estadio tumoral: 42%, 66% y 71% para el estadio I, II y III, respectivamente (Tabla 1, Figura 1B). Además, se encontró una correlación significativa positiva por Kendall entre los porcentajes de muestras positivas por IHQ y el estadio tumoral, como así también con la intensidad de la reacción y los estadios ($p < 0.05$). Cuando se compararon la reactividad y la intensidad de reacción de IDO con el grado nuclear, también se encontró una correlación significativa positiva ($p < 0.05$).

En la Figura 2 se observan microfotografías con reacción IDO+ en muestras de carcinoma ductal invasor; se observa un patrón citoplasmático predominante (Figura 2A, B, C) mientras que también se presenta una fuerte reacción nuclear. La figura 2D muestra una reacción negativa en una muestra de mama procedente de una patología benigna.

La Tabla 2 muestra los resultados por inmunohistoquímica expresados como porcentaje de muestras positivas para IDO entre los

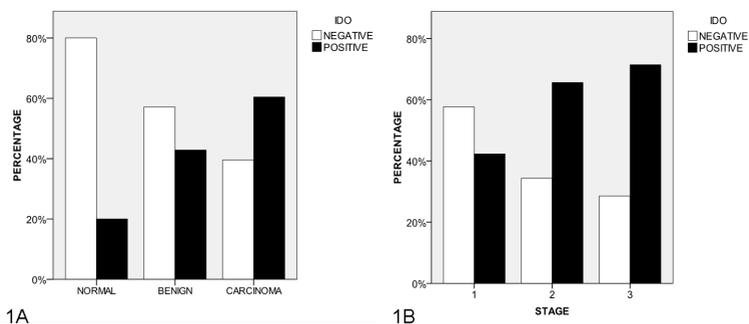


Figura 1: Expresión de IDO en muestras de cáncer de mama, patologías benignas y muestras normales de mama por IHQ.

A. Gráfico de barras que indica el porcentaje de muestras IDO+ (negro) e IDO- (blanco) versus diagnóstico.

B. Las barras indican el porcentaje de muestras IDO+ (negro) e IDO- (blanco) versus estadios tumorales (1, 2 y 3 representan los estadios I, II y III, respectivamente).

Tabla 1: Resultados por inmunohistoquímica de reacción de IDO en muestras de tejidos de mama normales, de patologías mamarias benignas y de cáncer de mama según estadios tumorales. Se expresa en porcentaje de muestras positivas respecto del número total de muestras.

Muestra tisular		Muestras IDO +/- n°total de muestras(%)
Normal		2/10 (20)
Benigna		9/21 (42,9)
Cáncer de mama	Estadio I	13/31 (42)
	Estadio II	24/36 (66)
	Estadio III	17/24 (71)
	Total	55/91 (60,4)

diferentes subgrupos en función de los receptores tumorales. IDO se expresó en el 43% de las muestras de cáncer de mama que fueron RE y/o RP positivas y negativas para HER2-neu, y también fueron positivas en el 80% del subgrupo triple negativo. Además, se obtuvo una correlación negativa significativa entre IDO y expresión de RE, mientras que se encontraron correlaciones no significativas cuando se consideraron la diferenciación histológica, el estado de RP y HER2-neu.

Expresión de IDO en líneas celulares de cáncer de mama por ICQ

Para analizar la expresión de IDO en líneas celulares de cáncer de mama, se realizó ICQ en líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF7 cultivadas sobre cubreobjetos. En todos los casos, IDO se expresó con un patrón citoplasmático (Figura 2E-F). Se obtuvieron resultados similares por inmunofluorescencia (Figura 2G-H).

Detección de IDO por RT-PCR

Por RT-PCR, se analizaron ARNm de 11 muestras de cáncer de mama, así como líneas celulares de cáncer de mama. Los amplicones se corrieron en gel de agarosa y se detectaron bandas a 251 pb en 4 muestras que presentaron reacción positiva para IDO por IHQ. En 7 muestras negativas para IDO por inmunohistoquímica, no se observaron bandas por RT-PCR (Figura 3).

Análisis de microvesículas en fracciones eluídas por cromatografía

La concentración media de proteínas de las fracciones de MV fue de 7,9 µg/ml de plasma con un máximo de 28,8 µg/ml y una mediana de 3,6 µg/ml. Por WB, se analizó la expresión de IDO, CD63 y CD9 en fracciones de MV aisladas de plasma de pacientes con de cáncer de mama. Luego de la incubación con anti-IDO y revelado por quimioluminiscencia de las membranas de nitrocelulosa, se obtuvieron ban-

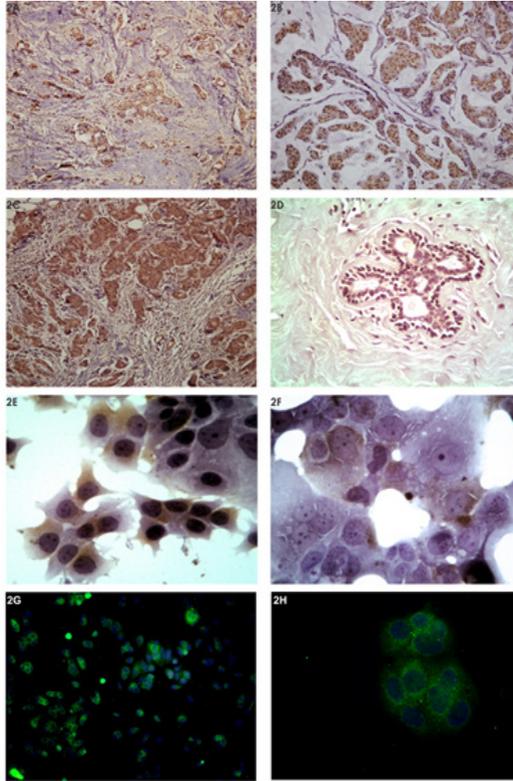


Figura 2: Microfotografías de muestras de cáncer de mama, de patologías mamarias benignas y líneas celulares de cáncer de mama incubadas con anti-IDO mediante IHQ (200X).

A. Muestra de CDI con una fuerte reacción, que presenta patrón citoplasmático y nuclear.

B. Muestra de CDI con una fuerte tinción nuclear y citoplasmática.

C. Sección de un conducto en una muestra de CDI con una reacción citoplasmática homogénea y fuerte tinción nuclear.

D. Muestra de patología mamaria benigna que presenta una reacción negativa por IHQ luego de la incubación con anti-IDO.

E. Reacción positiva por ICQ de un grupo de células de la línea celular MCF7.

F. Reacción positiva mediante ICQ de la línea celular T47D (200X).

G. Microfotografía de tinción de inmunofluorescencia de células de la línea celular MCF7

Incubadas con anticuerpo monoclonal anti-IDO; se observa reacción citoplasmática y perinuclear (100X).

H. y G. Microfotografías de la tinción de inmunofluorescencia de células de la línea celular MCF7 con anticuerpo monoclonal anti-IDO; se observa reacción en citoplasma y perinuclear con aumento 100X (H) y 1000X (G).

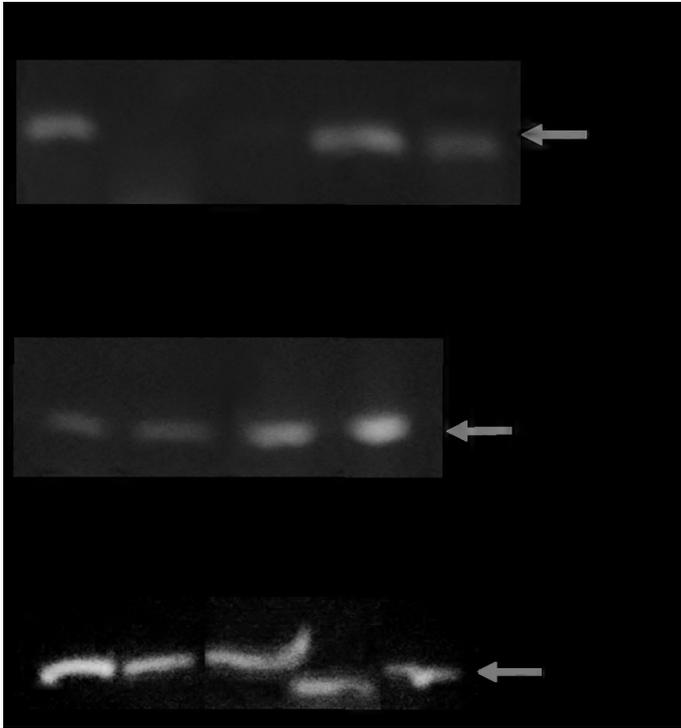


Figura 3: Geles de agarosa que presentan bandas de 251 pb correspondientes a amplicones de IDO. Las calles 1, 6 y 10 corresponden a la línea celular MCF7. Las calles 7, 12 y 14 corresponden a la línea celular MDA-MB-231 mientras que la 11 muestra una banda de la línea celular T47D. Las calles 4, 5, 8 y 9 corresponden a muestras de tumores primarios que muestran bandas a 251 pb mientras que las calles 2 y 3 muestran tumores que no presentan reacción para IDO. La calle 13 corresponde a una fracción exosomal de la línea celular MCF7 y muestra una banda a menos de 251 pb.

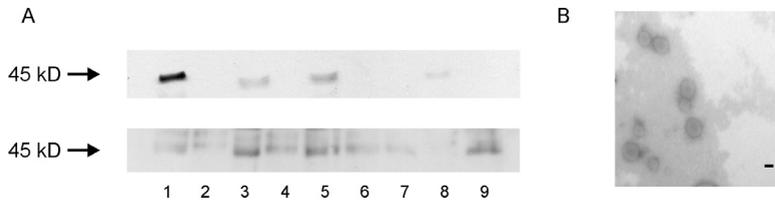


Figura 4: Resultados obtenidos con MV. 1-9 líneas corresponden a fracciones MV aisladas de muestras de plasma de pacientes con cáncer de mama.
 A. Western blot revelado con anti- IDO. Se puede observar una sola o doble banda en las líneas superior e inferior en las fracciones de MV.
 B. Microfotografía obtenida al microscopio electrónico de una fracción MV muestra la presencia de microvesículas esféricas con tinción negativa (ácido fosfotúngstico) en la periferia y en el centro de las estructuras cóncavas tipo exosoma de diámetro heterogéneo y con un rango de 50 a 200 nm (barra en la parte inferior derecha de la imagen representa 50 nm).

das de 42 kD en 9 de 25 (36%) muestras (Figura 4A). Los anticuerpos anti-CD9 y anti-CD63 se emplearon como marcadores de exosomas y 10 de las 25 muestras (40%) mostraron positividad para, al menos, un marcador. Cinco de nueve (56%) de las muestras reaccionaron tanto con anti-IDO como con los anticuerpos dirigidos a los marcadores de exosomas. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la detección de marcadores de exosomas y la edad, el estadio tumoral o tipos de receptores.

El análisis por microscopía electrónica de fracciones de MV mostró la presencia de pequeñas vesículas esféricas (50-200 nm) que ocasionalmente mostraban una forma de copa (Figura 4B).

Análisis molecular IDO 1

Para analizar los genes coexpresados con IDO 1 en plataformas de microarreglos de cáncer de mama, se utilizó la herramienta bioinformática Multiexperiment Matrix (MEM)¹. Los 50 genes coexpresados que

¹ Para más información, acceder a: <http://biit.cs.ut.ee/mem/>

presentaron correlación positiva son mostrados como filas, en un total de 76 plataformas de microarreglos y en las se ubican las muestras ($n = 4822$) (Figura 5A). Los valores de p correspondientes se indican al final de cada fila y en el mapa de calor obtenido, los cuadrados rojos indican un alto grado de coexpresión (Figura 5B). Luego analizamos estos genes en uno de las plataformas de microarreglos (GSE21653) (Sabatier *et al.*, 2011), en el que las muestras se agrupan según la clasificación molecular del cáncer de mama: luminal A, luminal B, erBB2, basal-like y normal-like. Los genes IDO y los coexpresados se muestran predominantemente en los subtipos basal y erBB2.

Para identificar las vías moleculares que fueron afectadas principalmente por estos 50 genes, buscamos redes de interacción proteína/gen. La red de interacción proteína-proteína se generó utilizando la base de datos STRING² y se representan como esferas azules y rojas (Figura 5C), relacionadas con diferentes funciones, tales como la regulación de la proliferación celular y la respuesta inflamatoria (azules) y la apoptosis (rojas).

Se ha establecido que el tipo molecular TNBC (cáncer de mama triple negativo) se puede clasificar en diferentes subtipos: basallike 1 y 2 (BL1 y 2), inmunomodulador (IM), mesenquimatoso (M), mesenquimatoso (MSL), y mediante receptor de andrógeno luminal (LAR) (Lehmann *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, se empleó la herramienta bioinformática TNBC Type (Chen *et al.*, 2012) para clasificar esas muestras etiquetadas como basales en el conjunto de datos GSE21653. Luego evaluamos la expresión IDO 1 en los subgrupos TNBC y encontramos que el subtipo IM mostró la expresión más alta de IDO (Figura 5D).

Discusión

IDO es una enzima supresora del sistema inmune y su alta expresión se asocia con un mal pronóstico en una variedad de tipos de cáncer.

² Para más información, acceder a: <http://string.embl.de/>

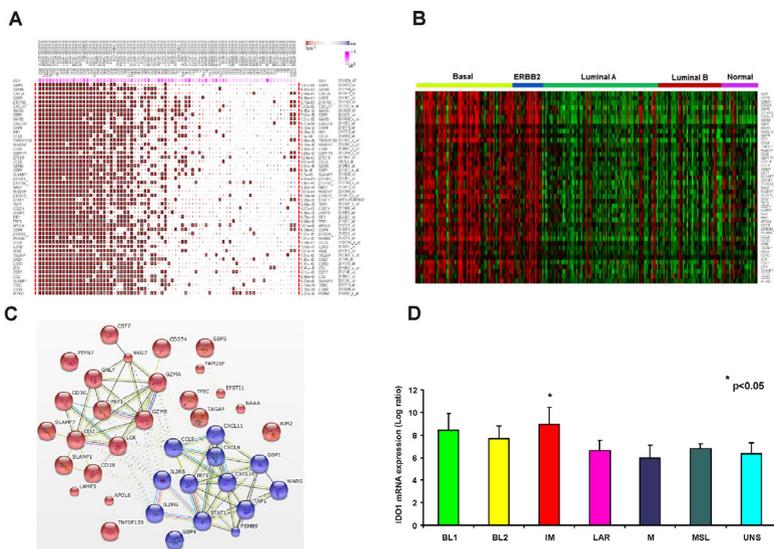


Figura 5: A. Análisis de genes coexpresados con IDO 1 a través de plataformas de microarreglos de cáncer de mama obtenido con una herramienta bioinformática Multiexperiment Matrix (MEM), <http://biit.cs.ut.ee/mem/>. Los 50 genes que presentaron mayor correlación positiva se muestran como filas, en un total de 76 estudios de microarreglos. En las columnas se hallan las muestras ($n = 4822$). Los valores p correspondientes se indican al final de cada fila. Mapa de calor: los cuadrados rojos denotan un gran rango de similitud.

B. Análisis de IDO 1 y genes coexpresados en uno de los estudios de microarreglos (GSE21653), en el que las muestras se agrupan según la clasificación molecular de cáncer de mama: luminal A, luminal B, erbB2, basal-like y normal-like. IDO 1 y los genes coexpresados se muestran, predominantemente en los subtipos basal y erbB2.

C. La red de interacción proteína-proteína se generó utilizando la base de datos STRING (<http://string.embl.de/>) en la que se observan esferas azules y rojas. Los genes del grupo azul están relacionados con la regulación de la célula, proliferación y respuesta inflamatoria, mientras que los genes del grupo rojo están asociados, principalmente, con la apoptosis.

D. Análisis de subtipos moleculares TNBC (cáncer de mama triple negativo) de muestras clasificadas como basales en la base de datos GSE21653 que emplea la herramienta bioinformática TNBCType: IDO presenta alta expresión en el subtipo inmunomodulador (IM), (BL1: basallike 1, BL2: basallike 2, M: mesenquimales, MSL: mesenquimales en forma de tallo y LAR: receptor de andrógenos luminales).

Las estrategias que emplean inhibidores de IDO pueden mejorar las respuestas inmunomediadas después de la quimioterapia convencional, y pueden ser sinérgicas con otras formas de inmunoterapia (Wang, Pan y Xia, 2009; Munn, 2012).

En esta investigación, se encontró que la expresión de IDO se detectó en el 60% de las muestras de cáncer de mama y su frecuencia aumentó en relación con la progresión del estadio tumoral. El patrón de reacción fue predominantemente citoplasmático, aunque también se observó la presencia de IDO en núcleos. Además, todas las líneas celulares tumorales aquí incluidas expresaron IDO. Aunque el 43% de las afecciones benignas de mama fueron positivas, la reacción fue más débil que en las muestras de cáncer de mama, mientras que se detectó una expresión significativamente menor en las muestras normales. Estos resultados fueron corroborados por RT-PCR.

Teniendo en cuenta los datos clínicos e histopatológicos, se halló una correlación estadísticamente significativa positiva entre la frecuencia de muestras IDO+ y el estadio tumoral, así como con el grado nuclear del tumor, mientras que se obtuvo una correlación negativa entre IDO y la expresión RE. En conjunto, estas observaciones indican que, aquellos tumores que expresan IDO, frecuentemente están asociados a mayores grados de malignidad.

En estudios previos sobre cáncer de mama que emplean detección de IDO por IHQ y ARNm, los resultados fueron variables. En concordancia con nuestros resultados, Yu *et al.* (2011) estudiaron muestras de cáncer de mama, patologías mamarias benignas y muestras normales adyacentes al tumor, encontrando mayor expresión de IDO en muestras de carcinoma y también una asociación con estadios tumorales avanzados y metástasis en ganglios linfáticos.

Por el contrario, en una serie de 155 pacientes con cáncer de mama, Jacquemier *et al.* (2012) han encontrado una correlación entre la expresión de IDO versus estadios que no presentan ganglios linfáticos afectados; aunque no incluyeron muestras normales para el análisis por IHQ. Sin embargo, considerando la expresión de RE, PR y HER2-

neu, encontraron una correlación significativa positiva entre la alta expresión de IDO y el cáncer de mama triple negativo. En cuanto a la asociación de la expresión IDO con tumores RE negativos, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por estos autores. Además, también hallaron un patrón de tinción citoplasmática y nuclear.

Finalmente, Soliman *et al.* (2013) han encontrado que la expresión de IDO se asoció con tumores que no presentan afectación de ganglios linfáticos y RE. Las divergencias entre los autores pueden estar relacionadas con diferencias en la composición de las cohortes estudiadas. Por otra parte, el uso de diferentes anticuerpos puede influir en los resultados de IHQ. Sin embargo, todos los grupos informaron una alta expresión de IDO en tumores de mama que puede estar relacionada con el papel que IDO ejercería en la supresión inmune dentro del microambiente tumoral.

Por otro lado, se ha sugerido que las microvesículas podrían actuar como un vehículo para transmitir señales inhibitorias de la respuesta inmune antitumoral. En las MV se han encontrado diferentes moléculas biológicamente activas como la proteína transmembrana ligando de Fas (FasL), APO2 / TRAIL, CD44 o antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estos hallazgos proporcionan una explicación razonable de su participación en la supresión inmune (Whiteside, 2011; Taylor y Gerçel-Taylor, 2005). Los exosomas interfieren directamente con las funciones de las células T efectoras al inducir la apoptosis en las células T activadas específicas de tumor y suprimir la citotoxicidad de células NK (Whiteside, 2013).

En nuestro estudio, se halló una asociación positiva de IDO en las microvesículas circulantes en 9 de 25 pacientes con cáncer de mama. Estas microvesículas mostraron un tamaño similar a exosomas mediante análisis al microscópico electrónico y expresan los marcadores de exosomas CD63 y CD9. El hallazgo de IDO en microvesículas derivadas de tumores podría reforzar el papel tolerogénico de esta enzima en pacientes con cáncer de mama no sólo a nivel local sino también en sitios distantes.

Finalmente, un análisis *in silico* de la expresión del gen IDO 1 en el cáncer de mama mostró que está asociado con varios genes relacionados con la respuesta inmune y la apoptosis. Las funciones involucradas en estas interacciones fueron, entre otras, la regulación de la apoptosis, la activación y diferenciación de linfocitos, las interacciones citoquina/ quimoquina-citoquina / receptor de quimoquina, señalización del receptor tipo Toll y citólisis.

El principio de “culpabilidad por asociación” establece que la coexpresión genética podría implicar mecanismos y roles reguladores compartidos en procesos biológicos relacionados. El gen IDO 1 y los genes coexpresados se muestran predominantemente en los subtipos basal y *erbB2*. Para clasificar esas muestras clasificadas como basales en la base de datos GSE21653, se evaluó la expresión de IDO 1 en los subgrupos de cáncer de mama triple negativo y se observó que el subtipo inmunomodulador mostraba la mayor expresión de IDO. Lehman *et al.* (2011) establecieron que el subtipo inmunomodulador está enriquecido en genes en los procesos inmunológicos, incluida la señalización de las células inmunes y las citoquinas, el procesamiento y presentación de antígenos y, también, la señalización a través de las vías de transducción de señales inmunológicas. El mismo grupo también descubrió que es probable que las características de IM sean exclusivas de las células tumorales y no del infiltrado de las células inmunes en el microambiente tumoral.

Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos en diferentes localizaciones que incluyen inhibidores de IDO en inmunoterapias combinadas (Khair *et al.*, 2019).

Conclusión

La presencia de IDO en las neoplasias de mama y en las microvesículas de cáncer de mama respalda la hipótesis de que esta enzima puede contribuir al escape tumoral de la inmunovigilancia del huésped y, en consecuencia, podría favorecer la diseminación tumoral. El análisis *in silico* refuerza esta relación no sólo a través de la alta expresión de

IDO1 y genes coexpresados en subtipos moleculares basales y erbB2 de cáncer de mama, sino también en el subtipo inmunomodulador dentro del TNBC. Estos resultados pueden tenerse en consideración para el desarrollo nuevas estrategias terapéuticas.

Referencias bibliográficas

- Bauer, T.M.; Jiga, L.P.; Chuang, J.J.; Randazzo, M.; Opelz, G.; Terness, P. (2005). "Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo". *Transpl Int*, 18(1), 95-100.
- Bauernhofer, T.; Kuss, I.; Henderson, B.; Baum, A.S.; Whiteside, T.L. (2011). "Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer". *Eur J Immunol*, 33(1), 119-24.
- Chen, X.; Li, J.; Gray, W.H.; Lehmann, B.D.; Bauer, J.A.; Shyr, Y.; Pietenpol, J.A. (2012). "TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer". *Cancer Inform*, 11, 147-56. doi: 10.4137/CIN.S9983.
- Croce, M.V.; Isla Larrain, M.T.; Demichelis, S.O.; Gori, J.R.; Price, M.R.; Segal-Eiras, A. (2003). "Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients". *Breast Cancer Res Treat*, 81(3), 195-207.
- Jacquemier, J.; Bertucci, F.; Finetti, P.; Esterni, B.; Charafe-Jauffret, E.; Thibult, M.L.; Houvenaeghel, G.; Van den Eynde, B.; Birnbaum, D.; Olive, D.; Xerri, L. (2012). "High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in the tumour is associated with medullary features and favourable outcome in basal-like breast carcinoma". *Int J Cancer*, 130(1), 96-104. doi: 10.1002/ijc.25979.
- Jaspersen, L.K.; Bucher, C.; Panoskaltis-Mortari, A.; Mellor, A.L.; Munn, D.H.; Blazar, B.R. (2009). "Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality". *Blood*, 114(24), 5062-70.
- Khair, D.O.; Bax, H.J.; Mele, S.; Crescioli, S.; Pellizzari, G.; Khiabany, A.; Nakamura, M.; Harris, R.J.; French, E.; Hoffmann, R.M.; Williams, I.P.; Cheung, A.; Thair, B.; Beales, C.T.; Touizer, E.; Signell, A.W.; Tasnova, N.L.; Spicer, J.F.; Josephs, D.H.; Geh, J.L.; Mac-

- Kenzie Ross, A.; Healy, C.; Papa, S.; Lacy, K.E.; Karagiannis, S.N. (2019). "Combining Immune Checkpoint Inhibitors: Established and Emerging Targets and Strategies to Improve Outcomes in Melanoma". *Front Immunol*. 10, 453. doi: 10.3389/fimmu.00453. eCollection 2019. Review.
- Lehmann, B.D.; Bauer, J.A.; Chen, X.; Sanders, M.E.; Chakravarthy, A.B.; Shyr, Y.; Pietenpol, J.A. (2011). "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies". *J Clin Invest*, 121(7), 2750-67. doi: 10.1172/JCI45014.
- Mellor, A.L.; Munn, D.H. (1999). "Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?" *Immunol Today*, 20(10), 469-473.
- Munn, D.H. (2012). "Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity". *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 734-45. Review.
- Munn, D.H.; Mellor, A.L. (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance". *J Clin Invest*, 117(5), 1147-54. Review.
- Munn, D.H.; Mellor, A.L. (2013). "Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses". *Trends Immunol*, 34(3), 137-43. doi: 10.1016/j.it.2012.10.001.
- Munn, D.H.; Shafizadeh, E.; Attwood, J.T.; Bondarev, I.; Pashine, A.; Mellor, A.L. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism". *J Exp Med*, 189(9), 1363-1372.
- Raulet, D.H. (2004). "Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response". *Nat Immunol*, 5(10), 996-1002. Review.
- Sabatier, R.; Finetti, P.; Cervera, N.; Lambaudie, E.; Esterni, B.; Mamelessier, E.; Tallet, A.; Chabannon, C.; Extra, J-M.; Jacquemier, J.; Viens, P.; Birnbaum, D.; Bertucci, F. (2011). "A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer". *Breast Cancer Res Treat*, 126(2), 407-20. PMID: 20490655.
- Soliman, H.; Rawal, B.; Fulp, J.; Lee, J.H.; Lopez, A.; Bui, M.M.; Khalil, F.; Antonia, S.; Yfantis, H.G.; Lee, D.H.; Dorsey, T.H.; Ambbs, S. (2013). "Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO 1) expression in

- breast cancer tissue by immunohistochemistry”. *Cancer Immunol Immunother*, 62(5), 829-37. doi: 10.1007/s00262-013-1393-y.
- Song, H.; Park, H.; Kim, Y.S.; Kim, K.D.; Lee, H.K.; Cho, D.H.; Yang, J.W.; Hur, D.Y. (2011). L-kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol*;11(8):932-8.
- Taylor, D.D.; Gerçel-Taylor, C. (2005). “Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects”. *Br J Cancer*, 92(2), 305-11.
- Taylor, M.W.; Feng, G.S. (1991). “Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism”. *FASEB J*, 5(11), 2516-22. Review.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979). “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”. *Proc Natl Acad Sci*, 76,4350-4354.
- Wang, H.; Pan, K.; Xia, J.C. (2009). “Interaction of indoleamine-2,3-dioxygenase and CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immune escape”. *Ai Zheng*, 28(2), 184-7. Review.
- Whiteside, T. L. (2005). “Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system?” *Br J Cancer*, 92(2), 209-11.
- Whiteside, T.L. (2013). “Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes)”. *Biochem Soc Trans*, 41(1), 245-51. doi: 10.1042/BST20120265. Review.
- Yu, J.; Sun, J., Wang, S.E.; Li, H.; Cao, S.; Cong, Y.; Liu, J.; Ren, X. (2011). “Upregulated expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in primary breast cancer correlates with increase of infiltrated regulatory T cells in situ and lymph node metastasis”. *Clin Dev Immunol*, 2011:469135. doi: 10.1155/2011/469135.

ROL DEL GEN RHBBD2 EN EL CÁNCER COLORRECTAL

Lacunza, Ezequiel¹

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) constituye la mayor causa de mortalidad y morbilidad por neoplasias del tracto digestivo en todo el mundo (Siegel, Miller y Jemal, 2019). La combinación de eventos moleculares que conducen al CCR es heterogénea e involucra alteraciones genéticas y epigenéticas (Punt, Koopman y Vermeulen, 2017). Esta heterogeneidad ha establecido subtipos moleculares que permitirían estratificar a los pacientes a fin de que reciban un tratamiento más específico y adecuado (Guinney *et al.*, 2015).

Aproximadamente el 30 % de los CCRs ocurren en el recto, siendo la tasa de incidencia mayor en hombres que en mujeres. En el cáncer de recto (CR) la cirugía cumple un rol crucial. En tumores rectales avanzados y en los tumores de recto bajo, cuya resección implica la necesidad de una amputación abdomino-perineal, la indicación actual es la terapia preoperatoria (neoadyuvante), que combina radio-

¹ Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Doctor en Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Investigador Adjunto. CONICET. Investigador. Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA) (UNLP).

terapia con quimioterapia [5-Fluorouracilo (5Fu) + Leucovorina] concomitante. Se ha observado, mediante el protocolo *watch and wait* (control clínico estricto sin operar a los pacientes salvo en el caso de que el tumor recidive), que algunos pacientes muestran respuesta clínica completa al tratamiento neoadyuvante, lo que evitaría la cirugía mayor (Bernier *et al.*, 2018). Sin embargo, aún no hay marcadores moleculares que permitan monitorear esta respuesta diferencial.

En estudios previos, demostramos que el gen RHBDD2 se encuentra sobreexpresado en estadios avanzados del CCR, que se asocia a estrés de Retículo Endoplasmático (RE), particularmente a la vía del UPR (del inglés: *Unfolding Protein Response*) y que su expresión se induce frente al 5Fu (Lacunza *et al.*, 2012; 2014). El UPR generalmente se activa en tumores sólidos y confiere resistencia a la apoptosis, la radioterapia y la quimioterapia (Hetz, Axten y Patterson, 2019). El UPR orquesta los mecanismos de adaptación para mantener una tasa óptima de producción de proteínas y reaccionar rápidamente a diversos estímulos, que incluyen respuesta a hormonas y factores de crecimiento, cambios en la homeostasis intracelular, cambios en el crecimiento y diferenciación celular. Si las condiciones estresantes persisten, sin embargo, las células pueden entrar en la muerte celular programada (Hsu *et al.*, 2019).

En este marco teórico nos planteamos como hipótesis que la sobreexpresión de RHBDD2 en estadios avanzados del CCR y su asociación al 5Fu puede tener impacto en la vía del UPR, proporcionando a las células tumorales un fenotipo resistente al estrés.

Métodos

Análisis de co-expresión e identificación de bioprocesos asociados a RHBDD2 en el contexto del CCR

Con el objetivo de identificar los procesos biológicos asociados a RHBDD2 en el contexto del CCR se empleó el principio de asociación por culpabilidad (Recuadro 3) basado en perfiles de expresión génica

(Singer *et al.*, 2005). Se utilizó la herramienta “Multiexperiment Matrix”² para obtener datos provenientes de 34 microarreglos asociados a CCR y se identificaron los genes que poseen un patrón de expresión similar al de RHBDD2 ($R > 0.5$, $p\text{value} < 0.001$). Del listado de genes que co-expresan con RHBDD2 en CCR, se seleccionaron los primeros 200 genes y se realizó un análisis de enriquecimiento funcional. Además, se determinaron los factores de transcripción (FT) asociados a los genes que co-expresan con RHBDD2 con mayor significancia estadística. Se empleó la herramienta bioinformática DAVID.

Cultivo celular

Empleamos como modelo celular dos líneas de cáncer de colon: HCT116 y Caco2. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (SIGMA, EEUU) suplementado con 20% de SFB (Bioser, Argentina), 10 U/ml penicilina G, y 10 mg/ml de estreptomycin. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en estufa de cultivo gaseada a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% CO₂.

Desarrollo de constructos para la sobreexpresión y el silenciamiento in vitro de RHBDD2 en líneas celulares de CCR

La línea celular CACO2 fue utilizada para sobreexpresar RHBDD2 debido a que posee baja expresión endógena del gen. Para la sobreexpresión se utilizó un vector pcDNA3.1-TOPO™ conteniendo el ADNc de RHBDD2 (GeneArt, Thermo Fisher, EEUU). La línea celular CACO2 que sobreexpresa establemente RHBDD2 será nombrada como TOPO-RHBDD2. Para el silenciamiento de RHBDD2 se utilizó la línea celular HCT116, con alta expresión endógena del gen. Las células fueron infectadas utilizando el vector lentiviral pLKO.1-TRC Cloning Vector (AddGene, EEUU) que contiene un inserto de shRNA (*small harping RNA*) con la secuencia complementaria al ARN men-

² Para más información, acceder a: <https://biit.cs.ut.ee/mem/>

sajero de RHBDD2. La línea celular HCT116 establemente silenciada para RHBDD2 será nombrada como SH-RHBDD2.

Tratamiento con 5Fu

Se empleó la droga 5Fu (SIGMA, EEUU) utilizando una solución de trabajo de concentración 100 μ M. Las concentraciones de tratamiento con 5Fu en los ensayos realizados fueron 5, 10 y 20 μ M. Los tiempos de tratamiento variaron de 6 a 96 hs.

Análisis de la expresión de RHBDD2, genes del UPR y moléculas de Adhesión a nivel del ARNm

De cada ensayo celular se extrajo el ARN total y las proteínas mediante el uso de TRIZOL (Invitrogen, EEUU). Mediante Real Time PCR se evaluó la expresión de RHBDD2, de los genes de la vía del UPR: BiP, PERK, ATF4, CHOP, ATF6 e IRE1 y de las moléculas de adhesión Talin-1 (TLN), Paxilina (PXN) y FAK.

Western blot

Se siguió el procedimiento estándar. Se empleó el anticuerpo policlonal anti-RHBDD2 (Origene, EEUU).

Inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas sobre vidrios de 20mm x 20mm, cultivadas durante 24hs con medio completo y luego tratadas con 5Fu. Concluido el período de tratamiento correspondiente, fueron fijadas en PBS/Formol 4%. Los vidrios se montaron en portaobjetos para realizar la inmunocitoquímica según procedimiento estándar.

Citometría de flujo, análisis de las fases del ciclo celular en los modelos in vitro

El análisis fue realizado utilizando un citómetro de flujo Becton and Dickinson FACSCalibur. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo 10.0.

Ensayo de cierre de herida

Para evaluar migración celular se realizó un ensayo de cierre de herida. Las células fueron sembradas en placas y cultivadas 24hs hasta alcanzar confluencia. Se realizaron dos estrías por placa utilizando un tip de 200ul. Se lavó con PBS para remover las células desprendidas y se incubó con el medio de cultivo correspondiente. El área de la herida fue capturada tomando imágenes en los tiempos 0, 6, 24, 30 y 48hs utilizando un microscopio invertido (Olympus, IX71) equipado con una cámara fotográfica (Olympus).

Ensayo de formación de colonias en agar

Para evaluar la capacidad de crecimiento libre de anclaje de las células se realizó un ensayo de formación de colonias en agar. Las colonias formadas fueron teñidas con Cristal Violeta y contadas al cabo de 20 días.

Muestras tisulares de tumores de recto

Se incluyeron 38 muestras pareadas (biopsias pre-tratamiento y piezas quirúrgicas post-tratamiento) de 19 pacientes con cáncer de recto que recibieron tratamiento neoadyuvante. Las muestras fueron provistas por el grupo GOCS (Grupo Oncológico Cooperativo del SUR) en colaboración con el Dr. Zwenger y por el Instituto de Oncología “Dr. Ángel Roffo” en colaboración con el Dr. Raffa. De cada muestra se obtuvieron los datos del informe histopatológico y de progresión

de la enfermedad. En todos los casos se contó con el consentimiento informado de los pacientes.

Inmunohistoquímica

Se siguió el procedimiento estándar. Para la recuperación antigénica se incubaron las muestras en buffer citrato de sodio 10mM a 100° C, 5 minutos. Para la detección de RHBDD2 se incubaron las muestras con un anticuerpo primario anti-RHBDD2 (Origene, EEUU) en dilución 1:200, durante toda la noche a 4°C.

Resultados y Discusión

El análisis de enriquecimiento funcional de genes que co-expresan con RHBDD2 en el CCR identifica procesos relacionados con el tráfico de membrana, las adhesiones focales y las vías de señalización asociadas a estrés

Con el objetivo de aproximar el rol funcional de RHBDD2 en el contexto del CCR, realizamos una aproximación in silico. Mediante el empleo de la herramienta MEM seleccionamos los top-200 genes que coexpresan con RHBDD2 en un total de 34 estudios de microarreglos asociados a tumores de CCR, que involucraron un total de 2600 muestras incluyendo tumores de CCR, tejido normal y líneas celulares de CCR. El enriquecimiento funcional de estos genes determinó 12 grupos funcionales principales con una significancia estadística de $p < 0.001$. Los términos biológicos incluyeron Transporte de Membrana, Transporte Mediado por Vesículas, Adhesión Focal, Unión a Cadherinas, Retención en lumen del RE y Autofagia, entre otros (Fig. 1a).

De un modo similar, determinamos los factores de transcripción (FT) que estuvieran asociados a los 200 genes seleccionados y luego filtramos aquellos para los que RHBDD2 fuera un gen diana, identificándose 25 FT. El enriquecimiento funcional de estos FT mostró 8 grupos funcionales asociados a UPR, Mitofagia (Autofagia), Adipogénesis y Diferenciación celular, entre otros ($p < 0.01$, Fig1b).

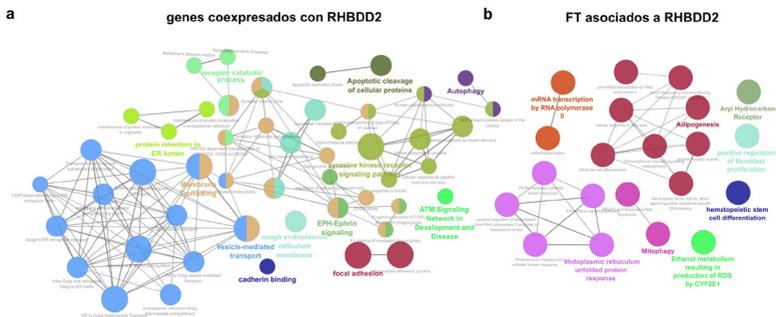


Figura 1: Análisis *in silico* de bioprocesos asociados a RHBDD2 en el contexto del CCR a) Enriquecimiento funcional de genes que co-expresan con RHBDD2 en el CCR. Se identificaron doce grupos significativamente asociados a los genes que co-expresan con RHBDD2. b) Enriquecimiento funcional de los factores de transcripción asociados a RHBDD2 en el CCR. Se identificaron siete grupos funcionales asociados a los FT que regularían al gen RHBDD2.

Colectivamente, estos resultados indican que RHBDD2 formaría parte de la vía biosintética secretora con asociación a la respuesta a estrés de RE, particularmente la vía UPR.

La expresión de RHBDD2 se induce frente al 5Fu en líneas celulares de cáncer de colon

En el presente estudio, evaluamos el efecto del 5Fu en la expresión de RHBDD2 a diferentes dosis y tiempos en las líneas celulares de cáncer de colon CACO2 y HCT116, que difieren a nivel fenotípico y molecular (Wang *et al.*, 2017). Los resultados mostraron una inducción temprana de la expresión de RHBDD2 en ambas líneas celulares (Fig. 2a). El aumento en la expresión génica estuvo acompañado por cambios notables en la forma y el tamaño de las células, probablemente como resultado de las condiciones estresantes generadas por el tratamiento con la droga. En particular, la expresión y localización de la proteína RHBDD2 también varió con el tiempo y la dosis del tratamiento. En

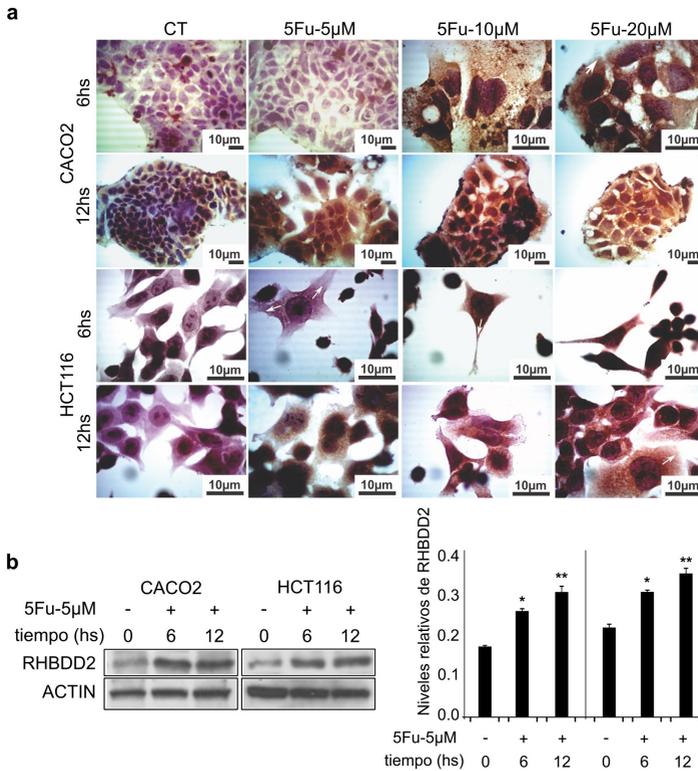


Figura 2: Expresión de RHBDD2 y respuesta celular al 5Fu en las líneas celulares de cáncer de colon CACO2 y HCT116. a) Se muestran imágenes de inmunocitoquímica, en las cuales la expresión de RHBDD2 (tinción marrón) se observa a diferentes dosis y tiempos de exposición al 5Fu. A dosis más altas y tiempos más prolongados, se evidencian cambios morfológicos en las células, que se acompañan de un aumento en la expresión de RHBDD2. La distribución de la proteína se extiende desde la periferia del núcleo hasta las proyecciones citoplasmáticas, con un patrón granular (flechas blancas). b) Western blot para RHBDD2 a las 6 y 12 h después de la exposición al 5Fu-5 μ M.

las células de control, su localización se restringió a la periferia del núcleo, mientras que en las células tratadas con dosis más altas de 5Fu, RHBDD2 se localizó en el citoplasma y las proyecciones citoplasmáticas, con un patrón granular (Fig. 2a). Estos cambios fueron más notorios en las células HCT116 en las que la distribución de RHBDD2, a medida que aumentó la dosis y el tiempo, mostró un patrón que se asemeja a un transporte mediado por vesículas (Fig. 2a). En ambas líneas celulares, el pico de expresión de RHBDD2 ocurrió a las 12 hs después de la adición de 5Fu-5 μ M (Fig. 2a, b).

En conjunto, estos resultados demuestran la estrecha correlación de la expresión de RHBDD2 y el tratamiento con 5Fu en líneas celulares de cáncer de colon. Además, se pudo observar que los cambios morfológicos de las células están acompañados por un aumento en la expresión de la proteína RHBDD2, lo que sugiere que, junto con la inducción de su expresión, varios procesos se ven afectados, impactando en la dinámica del citoesqueleto y en las propiedades de adhesión de las células.

La sobreexpresión y el silenciamiento de RHBDD2 tiene efectos opuestos sobre los procesos de proliferación, adhesión y resistencia al tratamiento con 5Fu

Con el objetivo de evaluar las consecuencias moleculares y fenotípicas de la sobreexpresión y el silenciamiento de RHBDD2, desarrollamos dos modelos in vitro contrastantes. Por un lado, un modelo que sobreexpresa establemente a la proteína RHBDD2 al que denominamos TOPO-RHBDD2; y por el otro, un modelo de silenciamiento estable en las células HCT116 denominado SH-RHBDD2. Los modelos fueron validados para la expresión de RHBDD2 mediante RT-qPCR, ICQ y Wb. Una vez establecidos los modelos, evaluamos el impacto de las variaciones de expresión sobre la migración y la adhesión celular a través del ensayo de la herida. La velocidad del cierre de herida es una medida de la velocidad del movimiento colectivo de las células, el cual involucra a los procesos de adhesión, migración y proliferación,

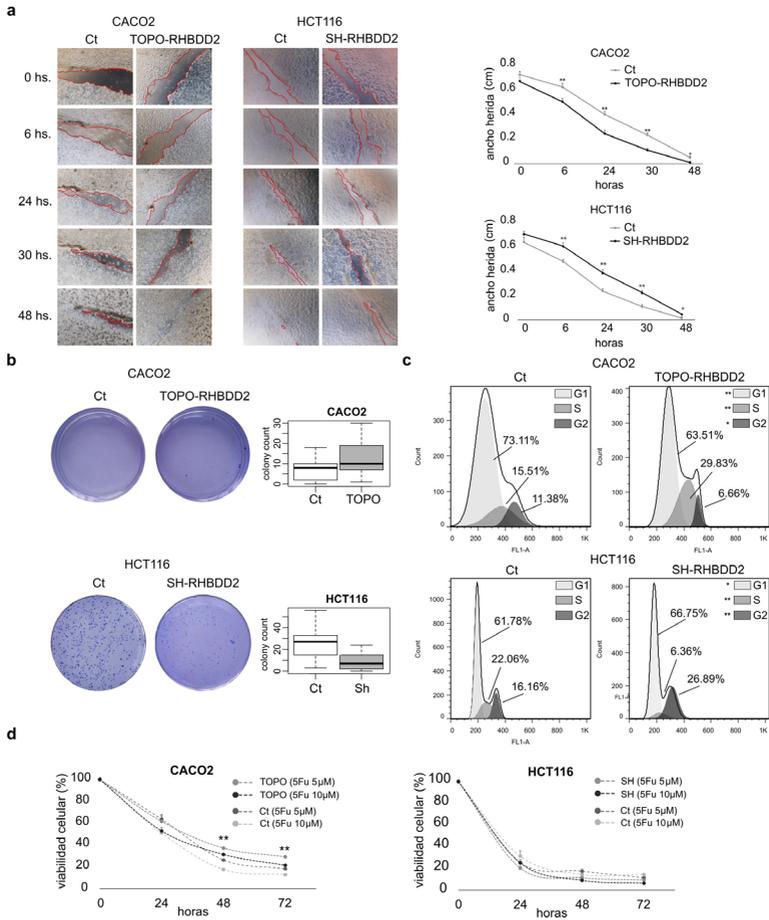
siendo los dos primeros los estadios iniciales en el avance del frente. La sobreexpresión de RHBDD2 aumentó la velocidad del cierre de la herida respecto a las células control (Ct) ($p < 0.01$). De modo similar, el silenciamiento de RHBDD2 causó el efecto opuesto, enlenteciendo el proceso de cierre de herida respecto a las Ct (Fig. 3a).

La proliferación, la adhesión y la motilidad están directamente relacionadas con el crecimiento tumoral; por lo tanto, evaluamos en los modelos *in vitro* el proceso de transformación maligna mediante el ensayo en agar de crecimiento de colonias libre de anclaje. La sobreexpresión de RHBDD2 dio como resultado un mayor crecimiento independiente del anclaje ($p < 0.01$; Fig. 3b). Observamos un aumento en el número y tamaño de las colonias formadas. Por el contrario, en las SH-RHBDD2 se observó una reducción dramática en el crecimiento independiente del anclaje ($p < 0.001$; Fig. 3b).

Por otro lado, mediante análisis de criometría de flujo se observó que en las TOPO-RHBDD2 aumentó significativamente la frecuencia de las células en fase S en comparación con las células Ct, con una disminución proporcional en las células de fase G1 ($p < 0.01$, Fig. 3c). Por el contrario, las células SH-RHBDD2 mostraron un aumento en las células G1 y una reducción significativa en células de fase S ($p < 0.01$, Fig. 3c).

Para evaluar el rol de RHBDD2 en la resistencia celular al tratamiento con 5Fu, las células fueron expuestas al fármaco a $5\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ durante 72 hs y luego se evaluó la viabilidad celular. La misma fue mayor en las células TOPO-RHBDD2 luego de las 24 hs en adelante (Fig. 3d). Además, las células Ct murieron al cabo de 72 h luego del tratamiento, mientras que las TOPO-RHBDD2 prevalecieron hasta las 96 hs post-tratamiento. Las SH-RHBDD2 no mostraron diferencias significativas respecto a las Ct (Fig. 3d).

Tomados en conjunto, estos resultados indican que las variaciones en la expresión de RHBDD2 afectan los procesos asociados a la adhesión celular, la migración, la proliferación y el crecimiento libre de anclaje de líneas celulares de CCR y que su mayor expresión está asociada a mayor agresividad y resistencia al 5 Fu.



*Figura 3: Ensayos fenotípicos sobre los modelos de sobreexpresión (TOPO-RHBDD2) en las CACO2 y silenciamiento (SH-RHBDD2) en las HCT116 y sus respectivos controles (Ct). a) Ensayo de cicatrización de herida. b) Ensayo de crecimiento de colonias libre de anclaje. c) Análisis de cartometría de flujo de las fases del ciclo celular en ambos modelos. d) Ensayo de resistencia al 5Fu en ambos modelos. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0,001$.*

RHBDD2 modula la expresión de genes del UPR

Luego analizamos las consecuencias de la expresión de RHBDD2 en la transcripción de genes del UPR en los dos modelos celulares. Los resultados indicaron un aumento significativo en la expresión de la chaperona BiP pero una reducción en la transcripción de IRE1, PERK y CHOP en las células TOPO-RHBDD2 en comparación con las células Ct. No se observaron variaciones significativas para los genes ATF4 y ATF6 (Fig. 4a). Cuando las células se expusieron al 5Fu, hubo un aumento marcado en la transcripción de PERK y ATF6 y una disminución significativa en la expresión de ATF4, IRE1 y CHOP (Fig. 4b). Con respecto a las células HCT116, hubo una reducción en BiP y PERK en las células SH-RHBDD2 en comparación con las células

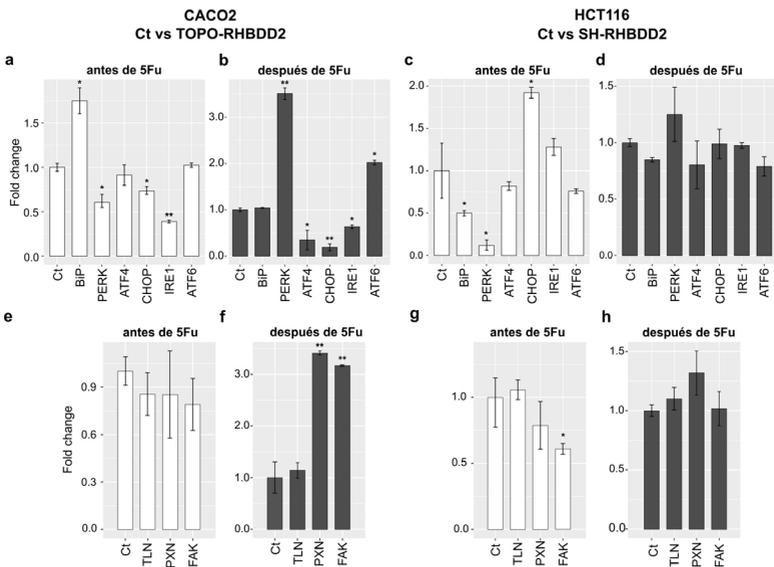


Figura 4: Resultados de análisis de Real Time PCR. Expresión de genes del UPR a), b), c) y d) y genes de adhesión focal e), f), g), h) en ambos modelos in vitro antes y después del tratamiento con 5Fu.

Ct, pero un aumento significativo de CHOP (Fig. 4c). En este caso, cuando las células se trataron con 5Fu, no se observaron diferencias en la expresión de los genes del UPR (Fig. 4d).

GPR78/BiP se encuentra usualmente sobreexpresado en células cancerosas. Una de sus funciones principales es proteger a las células contra la apoptosis inducida por el estrés, suprimiendo la inducción de CHOP, quien media la muerte celular como última alternativa del UPR (Reddy *et al.*, 2003; Fu, Li y Lee, 2007).

La expresión de RHBDD2 afecta la transcripción de los genes de adhesión focal FAK y PXN en respuesta al 5Fu

El enriquecimiento funcional predijo las adhesiones focales (AF) como una de los términos biológicos más significativos asociados a los genes coexpresados con RHBDD2 en el CCR (Fig. 1). La AF constituyen un enlace esencial entre las células tumorales y su microambiente circundante, estableciendo una estructura y puente funcional entre la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular. Los componentes de las AF transmiten señales al interior celular que eventualmente regulan procesos como motilidad, proliferación y supervivencia. La disregulación de AF ha sido asociada con radio-quimio-resistencia (Storch y Cordes, 2012).

Para determinar si la expresión de RHBDD2 afecta la expresión génica de AF, medimos los genes PXN, FAK y TLN en ambos modelos de líneas celulares, con y sin tratamiento con 5Fu. No se evidenciaron diferencias en las células TOPO-RHBDD2 comparadas con células Ct en condiciones normales de cultivo (Fig. 4e). Sin embargo, después del tratamiento con 5Fu (10 μ M, 6 h) hubo una significativa inducción de FAK y PXN en las células TOPO-RHBDD2 en comparación con las células Ct (Fig. 4f). Por el contrario, en las células HCT116, la caída de RHBDD2 modificó la expresión de FAK en comparación con las células Ct (Fig. 4g). La expresión de PXN también se redujo, pero no significativamente. No se observaron diferencias en ninguno de los genes analizados después del tratamiento con 5Fu (Fig. 4h).

Existe una conexión significativa entre el UPR y las AF. Se ha demostrado que una sobreexpresión de BiP en el CCR aumenta la migración celular y la invasión de la matriz extracelular a través de su interacción con la beta integrina y con FAK (Li *et al.*, 2013).

En general, estos resultados indican que la expresión de RHBDD2 tiene un impacto en la expresión de FAK o PXN, lo que explicaría en parte las alteraciones observadas en los procesos de adhesión y migración.

La alta expresión de RHBDD2 en tumores rectales después del tratamiento neoadyuvante se asocia con mal pronóstico

La siguiente etapa en este estudio fue evaluar por IHC la presencia de la proteína RHBDD2 en 38 muestras de tumor de CR provenientes de 19 pacientes antes y después de haber recibido tratamiento neoadyuvante. RHBDD2 mostró reacción positiva en todas las muestras pretratadas (19 casos de 19) con una prevalencia de moderada a alta intensidad de tinción. En el escenario posterior al tratamiento, hubo más variabilidad entre las muestras y una reducción significativa en la expresión de RHBDD2 en comparación con las muestras antes del tratamiento (Fig. 5a-panel superior, b). Sin embargo, hubo un grupo reducido de muestras en las que la expresión de RHBDD2 permaneció alta después del tratamiento (Fig. 5a-panel inferior, b). A nivel intratumoral se observó un aumento de la expresión de RHBDD2 en la secuencia normal adyacente a tumor-mucosa alterada-tumor invasor (Fig. 5c) Teniendo en cuenta los datos clínicos de los pacientes, se encontró una asociación significativa entre las muestras que mostraron elevada expresión de RHBDD2 después del tratamiento y el desarrollo de ganglios linfáticos o metástasis a distancia (valor de $p = 0,0181$, Fig. 5d).

Estos datos sugieren que la mayor expresión de RHBDD2 en una muestra pos-tratamiento se asocia a progresión de la enfermedad y en consecuencia baja respuesta al mismo. Asimismo, estos resultados

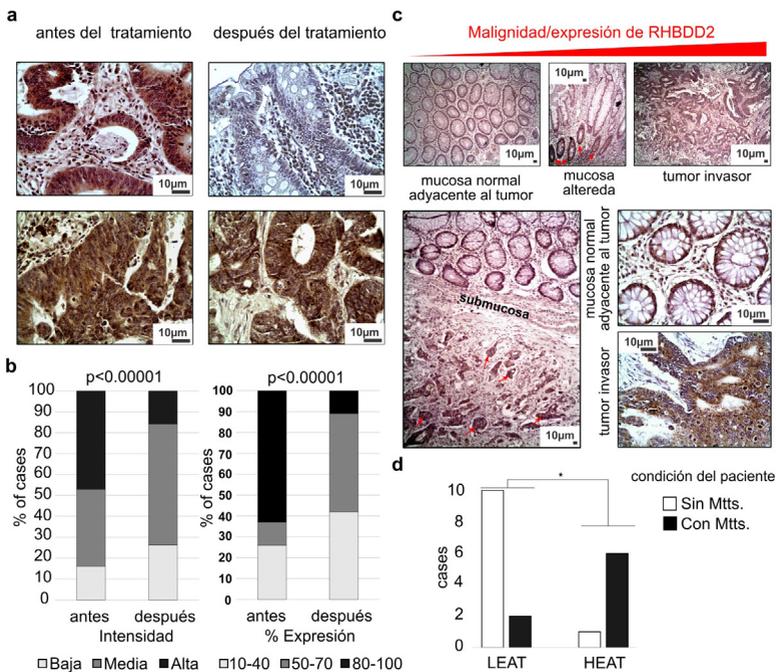


Figura 5: Expresión de la proteína RHBDD2 en muestras de tumor rectal antes y después del tratamiento neoadyuvante. a) Expresión de RHBDD2 (tinción marrón) en muestras pareadas de cáncer de recto. Todas las biopsias analizadas mostraron una expresión de RHBDD2 de moderada a alta antes del tratamiento, que disminuyó notablemente en la mayoría de las muestras después del mismo (panel superior); sin embargo, hubo un grupo reducido de muestras pareadas en las que la expresión de RHBDD2 permaneció alta después del tratamiento (panel inferior). b) La reducción en la expresión se evidenció tanto en la intensidad como en la distribución de la expresión en el tejido analizado (% de expresión) siendo significativo en ambos casos. c) La variación en la expresión de RHBDD2 también se observó a nivel intratumoral. El panel superior muestra tres microfotografías (10 ×) tomado de la misma sección de tejido de una biopsia del paciente después de recibir neoadyuvancia. De izquierda a derecha, se observa una secuencia de malignización junto a un aumento en la expresión de RHBDD2. Del mismo modo, en el panel inferior se muestra una sección de tejido obtenida de una biopsia de un paciente pretratado. En la misma fotografía (10 ×) se observa la aparente mucosa normal adyacente al tumor que invade las capas musculares. Aunque RHBDD2 mostró una expresión moderada en la mucosa normal aparente, se incrementa

notablemente en las células tumorales invasivas (flechas rojas). A la derecha, se muestra la ampliación (40x) de ambas regiones d) En base a la expresión de RHBDD2, las muestras posteriores al tratamiento se clasificaron en dos grupos: Baja expresión después del tratamiento (LEAT) y alta expresión después del tratamiento (HEAT). Se obtuvo una asociación significativa entre el grupo HEAT y la presencia de ganglios linfáticos o incluso metástasis a distancia (Mts).
 * $p = 0,0181$.

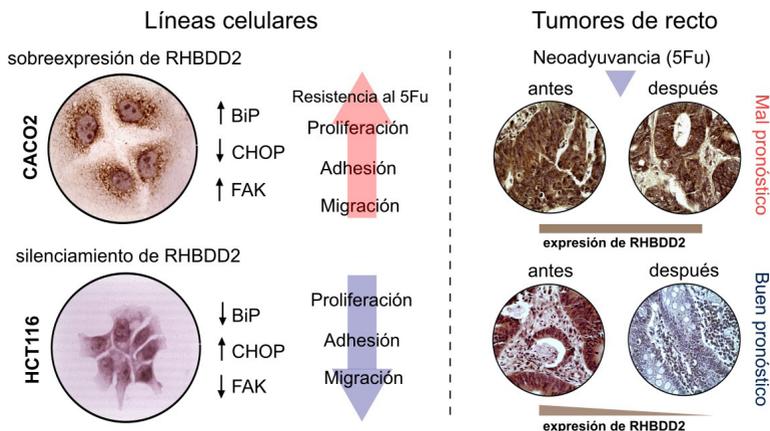


Figura 6: Figura resumen de los resultados más relevantes del estudio.

son consistentes con un estudio previo en el que demostramos que la sobreexpresión de RHBDD2 en el cáncer de mama se asocia con invasión de ganglios linfáticos (Abba *et al.*, 2009). Por otro lado, recientemente se demostró que RHBDD1, un pariente muy cercano de RHBDD2, promueve la metástasis de CCR a través de la vía de señalización Wnt (Zhang *et al.*, 2018).

Conclusiones

La Fig. 6 resume los resultados relevantes del estudio. La expresión inducida de RHBDD2 confiere resistencia al tratamiento con 5Fu en células de CCR. RHBDD2 favorece los procesos de proliferación, adhesión y migración celular. Modula directa o indirectamente la expresión de los genes del UPR BiP, PERK y CHOP, y los genes de AF FAK y PXN. En tumores de cáncer de recto la elevada expresión de RHBDD2 luego de la neoadyuvancia está relacionada con progresión de la enfermedad y un fenotipo metastásico. Monitorear la expresión de RHBDD2 durante el tratamiento neoadyuvante permitiría mejorar las decisiones de tratamiento durante la estrategia watch and wait.

Agradecimientos

PIP-2017-00159; PICT-2017-0418.

Referencias bibliográficas

- Abba, M.C.; Lacunza, E.; Nunez, M.I.; Colussi, A.; Isla-Larrain, M.; Segal-Eiras, A.; Croce, M.V.; Aldaz, C.M. (2009). "Rhomboïd domain containing 2 (RHBDD2): a novel cancer-related gene over-expressed in breast cancer". *Biochim Biophys Acta*. 1792(10), 988-997.
- Bernier, L.; Balyasnikova, S.; Tait, D.; Brown, G. (2018). "Watch-and-Wait as a Therapeutic Strategy in Rectal Cancer". *Curr Colorectal Cancer Rep*. 14(2),37-55.
- Fu, Y.; Li, J.; Lee, A.S. (2007). "GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen-starvation induced apoptosis". *Cancer Res*. 67(8), 3734-3740.
- Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reyniès, A.; Schlicker, A.; Soneson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; Bot, B.M.; Morris, J.S.; Simon, I.M.; Gerster, S.; Fessler, E.; De Sousa E Melo, F.; Missiaglia, E.; Ramay, H.; Barras, D.; Homicsko, K.; Maru, D.; Manyam, G.C.; Broom, B.; Boige, V.; Pe-

- rez-Villamil, B.; Laderas, T.; Salazar, R.; Gray, J.W.; Hanahan, D.; Taberero, J.; Bernards, R.; Friend, S.H.; Laurent-Puig, P.; Medema, J.P.; Sadanandam, A.; Wessels, L.; Delorenzi, M.; Kopets, S.; Vermeulen, L.; Tejpar, S. (2015). "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer". *Nat Med.* 21(11), 1350-1356.
- Hetz, C.; Axten, J.M.; Patterson, J.B. (2019). "Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention". *Nat Chem Biol.* 15(8), 764-775.
- Hsu, S.K.; Chiu, C.C.; Dahms, H.U.; Chou, C-K.; Cheng, C-M.; Chang, W-T.; Cheng, K-C.; Wang, H-M.D.; Lin, I-L. (2019). "Unfolded Protein Response (UPR) in Survival, Dormancy, Immunosuppression, Metastasis, and Treatments of Cancer Cells". *Int J Mol Sci.* 20(10), 2518.
- Lacunza, E.; Canzoneri, R.; Rabassa, M.E.; Pellon-Maison, M.; Croce, M. V.; Aldaz, C.M.; Abba, M.C. (2014). "Identification of signaling pathways modulated by RHBDD2 in breast cancer cells: a link to the unfolded protein response". *Cell Stress Chaperones.* 19(3), 379-388.
- Lacunza, E.; Canzoneri, R.; Rabassa, M.E.; Zwenger, A.; Segal-Eiras, A.; Croce, M. V.; Abba, M.C. (2012). "RHBDD2: a 5-fluorouracil responsive gene overexpressed in the advanced stages of colorectal cancer". *Tumour Biol.* 33(6), 2393-2399.
- Li, Z.; Zhang, L.; Zhao, Y.; Li, H.; Xiao, H.; Fu, R.; Zhao, C.; Wu, H.; Li, Z. (2013). "Cell-surface GRP78 facilitates colorectal cancer cell migration and invasion". *Int J Biochem Cell Biol.* 45(5), 987-994.
- Punt, C.J.; Koopman, M.; Vermeulen, L. (2017). "From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer". *Nat Rev Clin Oncol.* 14(4), 235-246.
- Reddy, R.K.; Mao, C.; Baumeister, P.; Austin, R.C.; Kaufman, R.J.; Lee, A.S. (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation". *J. Biol. Chem.* 278(23), 20915-20924.

- Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. (2019). "Cancer statistics". *CA Cancer J Clin.* 69(1), 7-34.
- Singer, G.A.C.; Lloyd, A.T.; Huminiecki, L.B.; Wolfe, K.H. (2005). "Clusters of co-expressed genes in mammalian genomes are conserved by natural selection". *Mol Biol Evol.* 22(3), 767-775.
- Storch, K.; Cordes, N. (2012). "Focal adhesion-chromatin linkage controls tumor cell resistance to radio- and chemotherapy". *Chemother Res Pract.* 2012, 319287.
- Wang, J.; Mouradov, D.; Wang, X.; Jorissen, R.N.; Chambers, M.C.; Zimmerman, L.J.; Vasaiakar, S.; Love, C.G.; Li, S.; Lowes, K.; Leuchowius, K-J.; Jousset, H.; Weinstock, J.; Yau, C.; Mariadason, J.; Shi, Z.; Ban, Y.; Chen, X.; Coffey, R. J.C.; Slebos, R.J.C.; Burgess, A.W.; Liebler, D.C.; Zhang, B.; Sieber, O.M. (2017). "Colorectal Cancer Cell Line Proteomes Are Representative of Primary Tumors and Predict Drug Sensitivity". *Gastroenterology.* 153(4),1082-1095.
- Zhang, M.; Miao, F.; Huang, R.; Liu, W.; Zhao, Y.; Jiao, T.; Lu, Y.; Wu, F.; Wang, X.; Wang, H.; Zhao, H.; Ju, H.; Miao, S.; Wang, L.; Song, W. (2018). "RHBDD1 promotes colorectal cancer metastasis through the Wnt signaling pathway and its downstream target ZEB1". *J Exp Clin Cancer Res.* 37(1), 60.

IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE ARNS LARGOS NO CODIFICANTES (LNCRNAS) CON IMPLICANCIA CLÍNICA EN EL CÁNCER COLORRECTAL Y ADENOMAS EN EL CONTEXTO DE LOS SUBTIPOS MOLECULARES CONSENSO

Lacunza, Ezequiel

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo; es responsable del 10% de las muertes causadas por cáncer (De Rosa *et al.*, 2015; Bray *et al.*, 2018). En Argentina según la IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre Cánceres¹) es el 2do cáncer más frecuente en ambos sexos. Si bien ha habido una disminución general en la mortalidad, el CCR se está diagnosticando en etapas más avanzadas de la enfermedad y a una edad más joven (45-50 años), lo que probablemente refleja cambios en el riesgo de enfermedad subyacente de etiología aún desconocida.

El CCR puede ser tratado mediante cirugía, quimioterapia (FOLFOX, FOLFIRI, CAPEOX) radioterapia y terapia dirigida (Cetuximab, Panitumimab, Bevacizumab). La elección del tratamiento dependerá del estadio del cáncer, la salud del paciente y la presencia de mutaciones genéticas específicas. Sin embargo, la respuesta de los pacientes a los tratamientos puede variar debido a la heterogeneidad molecular de la enfermedad y su variabilidad biológica y clínica, lo que subraya la importancia del conocimiento de las bases moleculares de cada

1 Para acceder a más información, visitar: <https://www.iarc.who.int/>

paciente y la realización de estudios personalizados para un mejor pronóstico en el contexto de la medicina de precisión (Fearon, 2011; Palma *et al.*, 2016; Dekker *et al.*, 2019; Di Nicolantonio *et al.*, 2021).

La mayoría de los CCR progresan desde el epitelio normal, a través de un adenoma precursor benigno, mediante la acumulación de alteraciones genéticas en oncogenes (p. ej., KRAS, BRAF, PIK3CA) y genes supresores de tumores (p. ej., APC, TP53, SMAD4) y aberraciones epigenéticas adicionales que están fuertemente implicadas en la iniciación y progresión del CCR 3. A nivel estructural, la inestabilidad cromosómica (CIN) ayuda a promover la invasión tumoral. De hecho, los desequilibrios en el número de cromosomas y la pérdida de heterocigosidad se observan en el 85 % de los tumores de CCR invasivos (The Cancer Genome Atlas Network, 2021). Además, aproximadamente el 15% de los tumores colorrectales en etapa temprana se caracterizan por una deficiencia en la reparación de errores de emparejamiento de ADN (MMR) secundaria, principalmente a la inactivación epigenética de MLH1; lo que da lugar a hipermutación e inestabilidad de microsatélites (MSI) (Vilar y Taberero, 2013).

La expresión génica está estrechamente relacionada con el fenotipo celular y el comportamiento del tumor y se ha utilizado ampliamente para identificar subtipos biológicamente homogéneos de la enfermedad. A nivel transcriptómico, Guinney *et al.* (2015) utilizaron perfiles basados en la expresión génica a gran escala de tumores de CCR primarios para identificar cuatro subtipos moleculares de consenso (CMS) distintos con características biológicas distinguidas: (i) CMS1, caracterizado por hipermutación, MSI, enriquecimiento en mutación BRAF-V600E y fuerte activación inmunológica; (ii) CMS2, un subtipo 'canónico' con marcada activación de la vía de señalización de WNT y MYC y dependencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); (iii) CMS3, enriquecido para mutaciones de KRAS y desregulación metabólica evidente; y (iv) CMS4, un subtipo mesenquimatoso, con activación prominente del factor de crecimiento transformante (TGF β), un microambiente inmunosupresor,

invasión del estroma y activación de la angiogénesis (*Ibíd.*, 2015). En un estudio posterior, sobre una gran cohorte de pólipos colorrectales esporádicos y hereditarios se reveló que CMS2 y CMS1 son los principales subtipos en la premalignidad (Chang *et al.*, 2018). En este sentido la poliposis adenomatosa familiar, el síndrome de Lynch y los pólipos adenomatosos convencionales poseen un fenotipo CMS2-epitelial canónico pudiendo progresar hacia la malignidad a los otros subtipos CMS dependiendo del microambiente tumoral y la activación de las vías moleculares subyacentes al tumor. Por otro lado, los adenomas serrados sésiles y los pólipos hiperplásicos parten de un subtipo CMS1 pudiendo progresar hacia un CMS4 con peor pronóstico (Chang *et al.*, Dienstmann *et al.*, 2017).

La clasificación CMS representa al momento la mejor descripción de la heterogeneidad molecular del CCR y tiene un claro potencial de uso clínico para predecir tanto el pronóstico como la respuesta a las terapias (Dienstmann *et al.*, 2017). Estudios prospectivos están apoyando la implementación de la taxonomía CMS en la práctica clínica (Ten Hoorn *et al.*, 2021).

Los ARN largos no codificantes (LncRNAs, del inglés Long non coding RNAs) se definen como ARNs que no codifican para proteínas y que superan los 200 nucleótidos de longitud. Poseen un rol clave en la regulación de la dinámica de la cromatina, la expresión génica, la regulación epigenética, el crecimiento y la diferenciación (Kopp y Mendell, 2018). Un número creciente de estudios ha demostrado la expresión aberrante de LncRNAs en cánceres humanos (Bhan, Soleimani y Mandal, 2017). En una serie de estudios previos identificamos LncRNAs específicos como inductores pro-oncogénicos en etapas tempranas del cáncer de mama o asociados a tumorigénesis en el contexto de infección por el virus del sarcoma de Kaposi (KSHV), lo que indica su papel relevante en el inicio y/o la progresión tumoral (Abba *et al.*, 2020; Fabre *et al.*, 2022; Naipauer *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que la desregulación de LncRNAs está estrechamente relacionada con el desarrollo y la progresión del CCR (Yang,

Junjie, Sanjun y Ma, 2017). Algunos LncRNA están sobreexpresados en los tumores y actúan como oncogenes, mientras que otros se encuentran sub-expresados y actúan como supresores de tumores (Ragusa *et al.*, 2015). Se pueden encontrar en los componentes de la sangre periférica, incluidos el suero y el plasma, lo que facilita su identificación por métodos poco invasivos (Xie *et al.*, 2016). Se ha demostrado que pueden ser biomarcadores efectivos para ayudar en la detección temprana del cáncer y la prevención de adenomas colorectales que se convierten en tumores malignos (Xu, Qi y Du, 2014; Chen *et al.*, 2021).

La integración de los LncRNAs con la clasificación molecular del CCR es un aspecto aún poco estudiado. Estratificar a los tumores en los subtipos CMS en ensayos clínicos reside en el perfil de expresión transcripcional de más de 200 genes codificantes (Guinney *et al.*, 2018; Morris *et al.*, 2021), lo que constituye una de las limitaciones para su interpretación e implementación definitiva en la práctica clínica. Al momento no existen signatures de LncRNAs asociados a los subtipos CMS.

La videocolonoscopia de detección es el método preventivo indicado a partir de los 45 años para examinar minuciosamente el colon y recto y posibilitar la detección y extirpación de pólipos previniendo el CCR. La introducción de la colonoscopia como método de prevención permitió la detección generalizada de adenomas precancerosos y cánceres asintomáticos prevalentes en etapas más tempranas del diagnóstico. Estas observaciones destacan un desafío importante para comprender mejor la diversidad molecular de los adenomas y de los tumores y desarrollar enfoques específicos para la prevención y tratamiento de la enfermedad en el marco de la medicina de precisión.

La desregulación en la expresión de los LncRNAs contribuye con el proceso de tumorigénesis colorrectal e impacta en las manifestaciones clínicas, como el tamaño del tumor, la metástasis en los ganglios linfáticos, el estadio TNM, la diferenciación, la invasión, la supervivencia del paciente y el resultado del tratamiento. Estos hallazgos ha-

cen que los LncRNAs sean atractivos como biomarcadores y blancos terapéuticos en el cáncer.

Al momento, no existen signatures de LncRNAs que sean distintivos de lesiones precancerosas del CCR ni de los subtipos moleculares que definen a los tumores. Estos repertorios de LncRNAs podrían ser evaluados en modelos preclínicos y en muestras de tumores y plasma de pacientes a fin de considerarlos herramientas moleculares específicas que puedan tener valor clasificador, diagnóstico, pronóstico o predictivo.

El objetivo del presente estudio fue identificar y validar paneles de LncRNAs con implicancias clínicas en adenomas y tumores colorrectales en el contexto de los subtipos moleculares consenso, que permitan la caracterización de biomarcadores específicos para cada subtipo, con el fin de mejorar la precisión en el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

Materiales y métodos

Análisis Bioinformático

Como indica la figura 1A, a partir de datos de expresión de ARNseq de 628 tumores primarios de CCR de GDC-TCGA-COREAD, descargados de UCSC Xena Browser, los clasificamos en los subtipos CMS con la herramienta CMScaller. Según un templatado de 485 genes codificantes, anotamos los LncRNAs y aplicamos DESeq2 para la comparación de cada CMS (CMSk) frente al resto (CMSK-k; pvalue <0.05, LogFC > 2).

Las listas obtenidas de los LncRNA sobreexpresados y exclusivos de cada CMS se evaluaron de acuerdo con las características moleculares del CCR, y el componente tumoral inmune, estromal o epitelial, utilizando el algoritmo ESTIMATE. Realizamos un análisis mediante curvas ROC con el paquete pRoc R/Bioconductor con el fin de obtener el repertorio de LncRNAs con mejor desempeño clasificador (Figura 2 A-B). La supervivencia global se estimó mediante el método

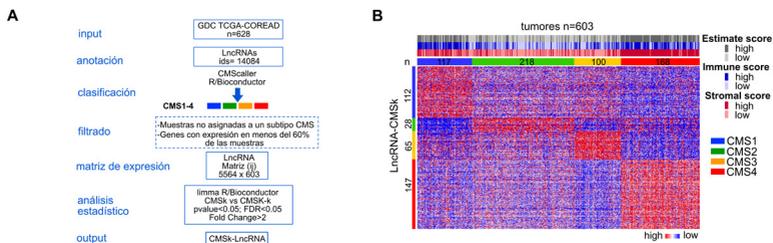


Figura 1: Análisis transcripcional para la identificación de LncRNAs asociados a los subtipos CMS sobre datos de GDC-TCGA-COREAD. A. Esquema simplificado del flujo metodológico. B. Mapa de calor del perfil de expresión de los LncRNAs diferencialmente sobreexpresados ($FC > 2$, $padj < 0.001$) en cada subtipo (CMSk) respecto al resto (CMSk-k) en los tumores de CCR. Según ESTIMATE se observa que los LncRNA-CMS1 se sobreexpresan en tumores enriquecidos en el componente inmune; los LncRNA-CMS4 se caracterizan por estar sobreexpresados en tumores con alto componente estromal; el bajo score observado en los tumores que expresan LncRNA-CMS2 y LncRNA-CMS3 coincide con el fenotipo epitelial de ambos subtipos CMS.

de Kaplan Meier (Figura 2 C-F). Por otro lado, a fin de determinar LncRNAs que estén desregulados en adenomas y en una etapa temprana de la carcinogénesis colorrectal, realizamos un análisis transcripcional de los mismos integrando diferentes estudios obtenidos de GEO, conteniendo muestras de mucosa normal, pólipos hiperplásicos (PH) y adenomas serrados y tubulares. Se procesaron con el paquete affy; para la integración y corrección del efecto de batch se empleó el paquete sva, ambos en R/Bioconductor.

Cohorte de estudio y obtención de muestras

El estudio se llevó a cabo en colaboración con el Hospital General de Agudos (HIGA) San Roque-Gonnet de La Plata. La cohorte de estudio incluyó individuos sanos y pacientes con adenomas o cáncer colorrectal (CCR) en estadios I-IV, reclutando participantes que cumplieran con los criterios de inclusión/exclusión. Los criterios de inclusión abar-

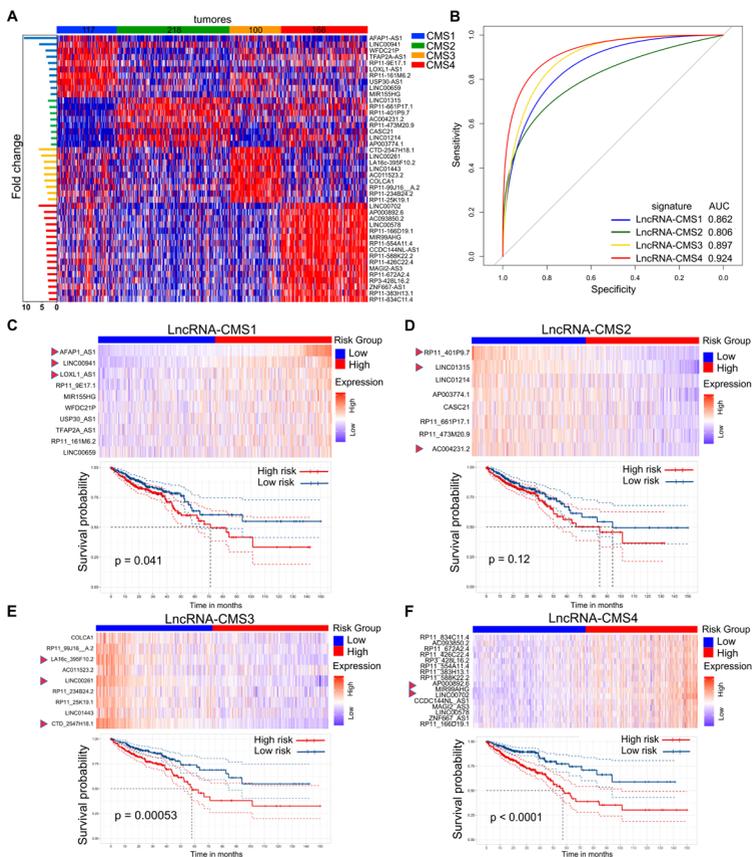


Figura 2: Signatures LncRNA-CMS_k, valor clasificador y pronóstico. A. Mapa de calor que representa el perfil de expresión de los signatures LncRNA-CMS_k resultantes con mejor desempeño clasificador según el análisis de ROC. A la derecha se indica el símbolo del gen, a la izquierda, se señalan las veces de cambio (Fold change) de cada LncRNA en cada subtipo (CMS_k) versus el resto (CMS_{k-k}). B. Curvas ROC y valores del área bajo la curva (AUC) para los 4 signatures E-H. Mapas de calor y curvas de Kaplan Meier representando el perfil de expresión y el valor pronóstico (supervivencia global) de los signatures LncRNA-CMS_k en los pacientes estratificados en los grupos bajo riesgo (azul) y alto riesgo (rojo) según el puntaje de riesgo ordenado de modo ascendente de izquierda a derecha. Las puntas de flecha señalan los LncRNAs representativos de cada signature cuyos niveles de expresión altos discriminan pacientes con alto riesgo (C, F) o bajo riesgo (D, E).

caron a individuos asintomáticos que buscaban la videocolonoscopia de screening, pacientes con diagnóstico previo de pólipos o CCR sin tratamiento resectivo, y pacientes sintomáticos con lesiones detectadas durante la videocolonoscopia diagnóstica. Los procedimientos incluyeron la obtención de muestras de sangre y biopsias, preservadas y almacenadas para análisis posterior.

Identificación y medición de LncRNAs mediante RT-qPCR

Se determinaron los niveles de expresión de LncRNAs en muestras pareadas de plasma y biopsias mediante la purificación de ARN y el análisis RT-qPCR. Se aisló el ARN total de las muestras de plasma utilizando el kit Plasma/Serum Total cfc-Nucleic Acid Advanced Purification Kit (Norgen, Biotek Corp) y el kit Total RNA Purification Kit (Norgen, Biotek Corp) para las biopsias, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo con qScript XLT one-step RT-qPCR ToughMix (Quanta BioSciences Inc.) en un sistema de PCR en tiempo real AriaMx Agilent. La normalización de los ensayos se realizó respecto a la expresión de RNA18S o 5S mediante el método del ciclo de umbral comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Se diseñaron las secuencias de cebadores utilizando el software Uni-pro U-Gen², ya contando con cebadores para la mayoría de los candidatos a evaluar. Para LncRNAs que generan varios transcritos, se alinearon las secuencias y se diseñaron cebadores sobre las regiones consenso, priorizando el extremo (Fearon, 2011). Se aseguró que el cebador Forward y el Reverse mapearan en exones distintos, con un intrón de por medio, y con un rango de amplicón resultante de 150 a 400 pb. Los productos de amplificación se verificaron y corrieron en geles de agarosa 1% coloreados con gel Green.

² Para acceder a más información: <http://ugene.net/>

Resultados

Identificación de LncRNAs específicos de los subtipos CMS

La figura 1A resume el flujo metodológico. Brevemente, se obtuvieron datos de expresión de ARNseq de 628 tumores primarios de CCR de GDC-TCGA-COREAD descargados de UCSC Xena Browser³. Se generaron las matrices de expresión (genes codificantes y no codificantes) y se anotaron los datos clínicos de los pacientes. Las muestras tumorales fueron clasificadas en los subtipos moleculares intrínsecos mediante la herramienta CMScaller según la expresión de un templatado de 485 genes codificantes (Eide *et al.*, 2017). Luego de la clasificación y el filtrado (se eliminaron las muestras no asignadas a un subtipo CMS y los LncRNAs con expresión en menos del 60% de los tumores), se estableció la matriz de expresión resultante: 5564 LncRNAs x 603 muestras tumorales. Se realizó la comparación entre los subtipos mediante el paquete limma R/Bioconductor y se obtuvieron los LncRNA distintivos (signature) y sobreexpresados ($FC > 2$, p ajustado < 0.01 , $FDR < 0.05$) en cada CMS (CMSk) respecto al resto (CMSk-k): LncRNA-CMS1 (n=112); LncRNA-CMS2 (n=28); LncRNA-CMS3 (n=65) y LncRNA-CMS4 (n= 147) (Figure1B). A fin de determinar el componente tumoral que pueda estar mayoritariamente expresando a los LncRNAs de cada subtipo CMS se realizó la clasificación de los tumores según el algoritmo ESTIMATE (Yoshihara *et al.*, 2021). Se observó que el signature LncRNA-CMS1 se asocia a tumores enriquecidos en el componente inmune ($p < 0.01$); LncRNA-CMS2 y LncRNA-CMS3 en el componente epitelial ($p < 0.01$) y LncRNA-CMS4 en el componente estromal ($p < 0.0001$) y el componente inmune ($p < 0.01$) (Figure1B). Estos resultados recapitulan la naturaleza intrínseca de los subtipos CMS y arrojan información sobre el rol que puedan tener los LncRNAs sobre la biología tumoral. Al respecto, los identificados en tumores CMS4, de carácter mesenquimal, podrían ser fundamentalmente expresados por células del estroma,

³ Para acceder a más información: <http://xena.ucsc.edu/>

lo que sugiere un rol relevante de los mismos en la configuración del microambiente tumoral.

Para obtener el repertorio de LncRNA con mejor desempeño clasificador realizamos un análisis mediante curvas ROC con el paquete pRoc R/Bioconductor considerando los niveles de expresión para cada LncRNA-CMSk (Figure 2A).

Los signatures resultantes quedaron constituidos por 10 genes para LncRNA-CMS1 (AUC=0.862), 8 genes para LncRNA-CMS2 (AUC=0.806), 9 genes para LncRNA-CMS3 (AUC=0.897) y 16 genes para LncRNA-CMS4 (AUC=0.924) (Figure 2B). Los LncRNA-CMSk se ajustaron a un modelo de regresión de Cox en el conjunto de todas las muestras. Se construyó una fórmula de puntaje de riesgo para cada signature ponderada por los coeficientes de regresión de Cox estimados para cada LncRNA de cada signature mediante los paquetes survival y ggrisk R/Bioconductor. Los pacientes con puntaje de riesgo asignado fueron clasificados en grupos de alto o bajo riesgo utilizando la mediana como punto de corte (Figure 2C-F). La supervivencia global se estimó mediante el método de Kaplan-Meier. La prueba de rango logarítmico fue utilizada para determinar las diferencias de supervivencia entre los grupos (Figure 2C-F).

Los cuatro signatures demostraron una eficiencia que va desde muy buena (AUC>8) hasta excelente (AUC>9) en la discriminación de subtipos moleculares (Figure 2B). Además, los signatures LncRNA-CMS1, LncRNA-CMS3 y LncRNA-CMS4 mostraron un valor pronóstico significativo ($p<0.05$) (Figure 2C-F). En el caso de LncRNA-CMS1, los pacientes de alto riesgo exhibieron una mayor expresión de los LncRNAs asociados, especialmente AFAP1-AS1, LINC00941 y LOXL-AS1, según se observa en el mapa de calor de la Figura (Figure 2C). Contrariamente, LncRNA-CMS3 reveló que los pacientes de alto riesgo con peor pronóstico mostraron una marcada disminución en la expresión de los LncRNAs, sugiriendo un papel supresor de tumor (Figure 2E), con LINC00261 y CTD2547H18.1 como principales reguladores (Figure 2E). Por último, el signature LncR-

NA-CMS4 presentó un valor pronóstico significativo asociado a la mayor expresión en pacientes de alto riesgo, destacando LINC00702 y MIR99AHG (Figure 2F). El repertorio de LncRNA-CMS2 mostró una tendencia, aunque no significativa, a un mejor pronóstico cuando está sobreexpresado, con LINC01315, RP11401P9.7 y LINC01214 como destacados (Figure 2D).

Identificación de LncRNAs distintivos de etapas tempranas de la carcinogénesis colorrectal

A fin de determinar LncRNAs que estén desregulados en adenomas y en una etapa temprana de la carcinogénesis colorrectal, realizamos un análisis transcripcional de los mismos integrando diferentes estudios (GSE10714, GSE19963, GSE4183, GSE45270, GSE8671, GSE79462) obtenidos de GEO⁴, conteniendo muestras de mucosa normal, pólipos hiperplásicos (PH) y adenomas serrados y tubulares. Obtuvimos una matriz de expresión para un total de 5400 LncRNAs en 128 muestras (46 normales, 16 PH y 67 adenomas). Clasificamos las muestras en los subtipos CMS, siendo predominante CMS2 en adenomas, seguido de CMS1 en PH. Realizamos la comparación Normal vs Adenomas (tubulares y serrados) e identificamos 300 LncRNAs diferencialmente expresados ($FC > 2$, $p < 0.01$). En la figura 4 se indican los más significativos (Figure 3A). Entre ellos, destacamos los top-5 (CRNDE, PVT1, UCA1, LINC01315 y ZFAS1) (Figure 3B); como potenciales marcadores a evaluar, debido a cumplir con alguno de los siguientes criterios: a) Mostraron las mayores diferencias Normal-Adenoma; b) Se expresan en la mayoría de las muestras; c) Poseen niveles altos de expresión; c) Han sido asociados previamente a progresión de CCR en etapas tempranas o avanzadas de la enfermedad 28-30; d) Han sido detectados en plasma de pacientes con CCR (Liu *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017).

4 Para acceder a más información: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

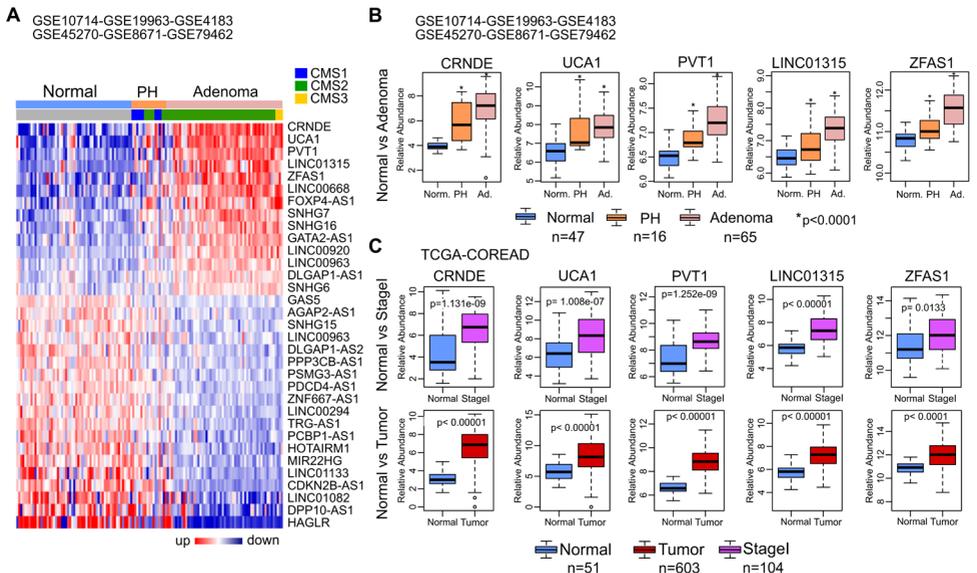


Figura 3: LncRNAs asociados a adenomas colorrectales. A. Mapa de calor en el que se observan los LncRNAs más diferencialmente expresados entre muestras de mucosa normal, pólipos hiperplásicos (PH) y adenomas (FC>2, $p < 0.001$). B. Perfil de expresión de los top-5 LncRNAs seleccionados para evaluar en pacientes con adenomas. C. Perfil de expresión de los LncRNAs seleccionados en la comparación Normal vs Estadio I (StageI) y Normal vs Tumor.

Indagamos luego si los LncRNAs seleccionados se encuentran igualmente desregulados en la comparación Normal vs Estadio I (StageI; AJCC) y Normal vs Tumores $p < 0.01$ en los datos del TCGA-COREAD. Los cinco candidatos mostraron niveles de expresión significativamente más altos ($p < 0.01$) frente a tumores en el estadio inicial de la carcinogénesis colorrectal y frente a tumores en general, independientemente del estadio (Figure 3C); lo que señala el carácter pro-oncogénico de estos LncRNAs. Vale destacar que el repertorio de LncRNAs asociados a adenomas es distinto al establecido para los cuatros subtipos CMS. La menor variación de subtipos entre muestras

de adenomas (en comparación con los tumores) sería coincidente con lo postulado por Chang *et al.* (2018), en el que demuestran que los adenomas esporádicos son en su mayoría del subtipo CMS2, es decir de características moleculares similares, y que en la progresión hacia la malignidad se diversificarían en los otros subtipos dependiendo de qué vía molecular de la carcinogénesis colorrectal se active (*Ibíd.*).

Identificación y medición de LncRNAs mediante RT-qPCR en muestras de tejido y plasma

Para evaluar y validar la detectabilidad de algunos LncRNAs candidatos, se obtuvieron muestras de biopsias tisulares y líquidas de participantes del estudio. La medición de los LncRNAs seleccionados (EGFR1-AS1, COLCA1, AFAP1-AS1, UCA1) fue exitosa, revelando variaciones de expresión en la comparación entre tejido normal y tumoral, así como entre diferentes muestras tumorales y controles. Estos resultados destacan la heterogeneidad molecular subyacente en el cáncer colorrectal (Figura 4). EGFR1-AS1 y AFAP1-AS1 mostraron mayores niveles de expresión en tumores en comparación con tejido normal (Figura 4 A-B). Además, algunos tumores exhibieron niveles significativamente más altos de expresión de COLCA1, EGFR-AS1 y UCA1, sugiriendo una posición potencial entre los subtipos CMS2 y CMS3 (Figura 4 B-C).

Adicionalmente, se evaluó la detectabilidad y los niveles de expresión de los LncRNAs EGFR-AS1 y COLCA1 en el plasma de individuos sanos y en aquellos con tumores. De manera notable, ambos LncRNAs fueron detectados en el plasma, y COLCA1, en particular, exhibió niveles significativamente más elevados en individuos con tumores en comparación con los individuos sanos. Estos hallazgos sugieren que COLCA1 podría ser un biomarcador de interés que merece un estudio más detenido.

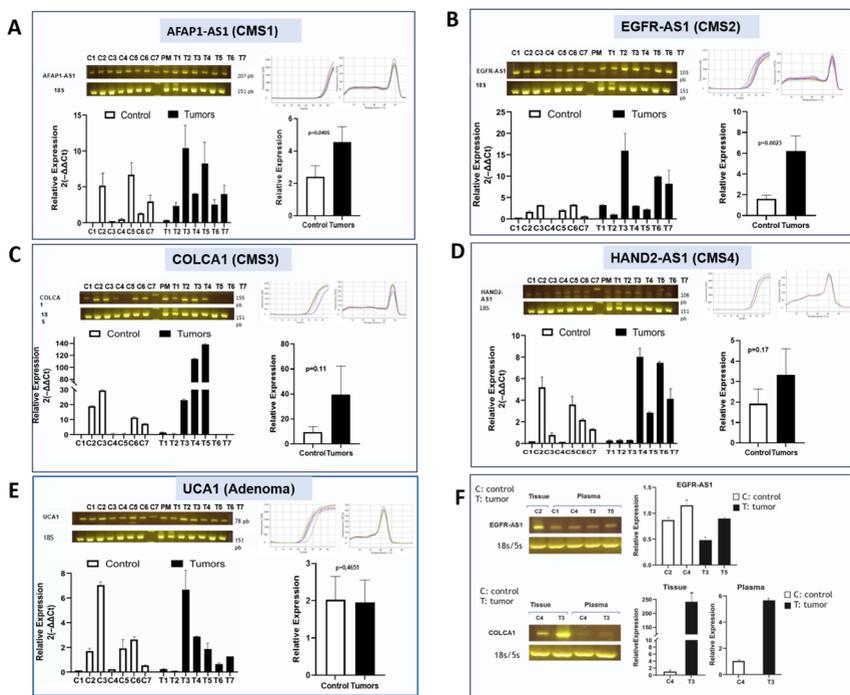


Figura 4: Validación clínica de los signatures de LncRNAs-CMSk. A-E. Perfil de expresión y gel de electroforesis de LncRNAs candidatos evaluados en biopsias de tejido obtenidas de 7 individuos sanos y 7 individuos con tumores colorrectales. F. Perfil de expresión y gel de electroforesis de los LncRNAs EGFR-AS1 (CMS2) y COLCA1 (CMS3) evaluados en plasma libre de células.

Conclusiones

Mediante análisis bioinformático pudimos identificar signatures de LncRNAs distintivos de lesiones precancerosas y de tumores colorrectales correspondientes a los subtipos CMS1-4. Pudimos validar la detectabilidad de AFAP1-AS1, EGFR-AS1, HAND2-AS1, COLCA1 y UCA1 en muestras de tejido y plasma tanto de individuos sanos como

de aquellos con lesiones de CCR. Los LncRNA mostraron variabilidad intertumoral, lo que define la heterogeneidad molecular entre los pacientes. Se identificaron LncRNAs candidatos con expresión variable en los modelos celulares lo que indica su potencial como biomarcadores de progresión y respuesta a terapia. Actualmente en su fase piloto de validación clínica este estudio aporta un enfoque cuantitativo de tamizaje de LncRNAs específicos de lesiones precancerosas y tumores colorrectales a partir de un método poco invasivo (extracción de sangre) o de práctica de rutina preventiva (videocolonoscopia) con potencial diagnóstico, pronóstico y capacidad de estratificar tumores en subtipos moleculares homogéneos. Adicionalmente, se evaluó la detectabilidad y los niveles de expresión de los LncRNAs EGFR-AS1 y COLCA1 en el plasma de individuos sanos y en aquellos con tumores. De manera notable, ambos LncRNAs fueron detectados en el plasma, y COLCA1, en particular, exhibió niveles significativamente más elevados en individuos con tumores en comparación con los individuos sanos. Estos hallazgos sugieren que COLCA1 podría ser un biomarcador de interés que merece un estudio más detenido.

Agradecimientos

Agradezco a la Lic. Marcela Astiz por sus valiosos aportes experimentales, fundamentales para la obtención de datos relevantes y la elaboración de contenidos en la sección de validación. También expreso mi agradecimiento al Dr. Mariano Di Tommaso y al equipo del Servicio de Gastroenterología del Hospital San Roque Gonnet por la provisión de muestras y datos de los participantes. Reconozco la contribución del Dr. Martin Abba por su revisión y opiniones siempre constructivas. Agradezco a la Dra. María Virginia Croce por su amable invitación a participar en el ciclo de charlas. Además, agradezco a todos los participantes anónimos que, al firmar el consentimiento informado, contribuyeron con sus muestras a este estudio.

Referencias bibliográficas

- Abba, M.C.; Canzoneri, R.; Gurruchaga, A.; Lee, J.; Tatineni, P.; Kil, H.; Lacunza, E.; Aldaz, C.M. (2020). LINC00885 a novel oncogenic long non-coding RNA associated with early stage breast cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* (19):7407.
- Bhan, A.; Soleimani, M.; Mandal, S.S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* 1;77(15):3965-3981.
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6):394-424.
- Chang, K.; Willis, J.A.; Reumers, J.; Taggart, M.W.; San Lucas, F.A.; Thirumurthi, S.; Kanth, P.; Delker, D.A.; Hagedorn, C.H.; Lynch, P.M.; Ellis, L.M.; Hawk, E.T.; Scheet, P.A.; Kopetz, S.; Arts, J.; Guinney, J.; Dienstmann, R.; Vilar, E. (2018). Colorectal premalignancy is associated with consensus molecular subtypes 1 and 2. *Ann Oncol.* 1;29(10):2061-2067.
- Chen, S.; Fang, Y.; Sun, L.; He, R.; He, B.; Zhang, S. (2021). Long Non-Coding RNA: A Potential Strategy for the Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 11:76275211:762752.
- De Rosa, M.; Pace, U.; Rega, D.; Costabile, V.; Duraturo, F.; Izzo, P.; Delrio, P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep.* 34(3):1087-96.
- Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet.* 19;394(10207):1467-1480.
- Di Nicolantonio, F.; Vitiello, P.P.; Marsoni, S.; Siena, S.; Tabernero, J.; Trusolino, L.; Bernardis, R.; Bardelli, A. (2021). Precision oncology in metastatic colorectal cancer — from biology to medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 18, 506–525.
- Dienstmann, R.; Vermeulen, L.; Guinney, J.; Kopetz, S.; Tejpar, S.; Tabernero, J. (2017). Consensus molecular subtypes and the evolu-

- tion of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 17(2):79-92
- Eide, P.W.; Bruun, J., Lothe, R.A.; Sveen, A. (2017) CMScaller: an R package for consensus molecular subtyping of colorectal cancer pre-clinical models. *Sci Rep*. 30;7(1):16618.
- Fabre, M.L.; Canzoneri, R.; Gurruchaga, A.; Lee, J. Tatineni, P.; Kil, H.; Lacunza, E.; Aldaz, C.M.; Abba, M.C. (2022). MALINC1 an Immune-Related Long Non-Coding RNA Associated with Early-Stage Breast Cancer Progression. *Cancers* (Basel). 7;14(12):2819.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 6 (1), pp. 479-507
- Graham, L.D.; Pedersen, S.K.; Brown, G.S.; Ho, T.; Kassir, Z.; Moynihan, A.T.; Vizgoft, E.K.; Dunne, R.; Pimlott, L.; Young, G.P.; Lapointe, L. C.; Molloy, P.L. (2011). Colorectal Neoplasia Differentially Expressed (CRNDE), a Novel Gene with Elevated Expression in Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Genes Cancer*. 2(8):829-40.
- Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reyniès, A.; Schlicker, A.; Sonesson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; Bot, B.M.; Morris, J.S.; Simon, I.M.; Gerster, S.; Fessler, E.; De Sousa E Melo, F.; Missiaglia, E.; Ramay, H.; Barras, D.; Homicsko, K.; Maru, D.; Manyam, G.C.; Broom, B.; Boige, V.; Perez-Villamil, B.; Laderas, T.; Salazar, R.; Gray, J.W.; Hanahan, D.; Tabernero, J.; Bernardis, R.; Friend, S.H.; Laurent-Puig, P.; Medema, J.P.; Sadanandam, A.; Wessels, L.; Delorenzi, M.; Kopets, S.; Vermeulen, L.; Tejpar, S. (2015). "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer". *Nat Med*. 21(11), 1350-1356.
- Jiang, H.; Wang, Y.; Ai, M.; Wang, H.; Duan, Z.; Wang, H.; Zhao, L.; Yu, J.; Ding, Y.; Wang, S. (2017). Long noncoding RNA CRNDE stabilized by hnRNPUL2 accelerates cell proliferation and migration in colorectal carcinoma via activating Ras/MAPK signaling pathways. *Cell Death Dis*. 8(6):e2862.

- Kopp, F.; Mendell, J.T. (2018). Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell* 25;172(3):393-407.
- Liu, T.; Zhang, X., Gao, S., Jing, F.; Yang, Y.; Du, L.; Zheng, G.; Li, P.; Li, C.; Wang, C. (2016). Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 20;7(51):85551-85563.
- Morris, J.S.; Luthra, R.; Liu, Y.; Duose, D. Y.; Lee, W.; Reddy, N.G.; Windham, J.; Chen, H.; Tong, Z.; Zhang, B.; Wei, W.; Ganiraju, M.; Broom, B.M.; Alvarez, H.A.; Mejia, A.; Veeranki, O.; Routbort, M.J.; Morris, V.K.; Overman, M.J.; Menter, D.; Katkhuda, R.; Wistuba, I.I.; Davis, J.S.; Kopetz, S.; Maru, D. M. (2021). Development and Validation of a Gene Signature Classifier for Consensus Molecular Subtyping of Colorectal Carcinoma in a CLIA-Certified Setting. *Clin Cancer Res* ;27(1):120-130.
- Naipauer, J.; García Solá, M.E.; Salyakina, D.; Santas, R.; Williams, S.; Coso, O.; Abba, M.C.; Mesri, E.A.; Lacunza, E. (2021). A Non-Coding RNA Network Involved in KSHV Tumorigenesis. *Front Oncol*. 16;11:687629.
- Palma, S.; Raffa, C.I.; Garcia-Fabiani, M.B.; Ferretti, V.A.; Zwenger, A.; Perez Verdera, P.V.; Llontop, A.; Rojas Bilbao, E.; Cuartero, V.; Abba, M.C.; Lacunza, E. (2020). RHBDD2 overexpression promotes a chemoresistant and invasive phenotype to rectal cancer tumors via modulating UPR and focal adhesion genes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1;1866(8):165810.
- Palma, S.; Zwenger, A.O.; Croce, M.V.; Abba, M.C.; Lacunza, E. (2016). From Molecular Biology to Clinical Trials: Toward Personalized Colorectal Cancer Therapy. *Clin Colorectal Cancer*. 15(2):104-15.
- Ragusa, M.; Barbagallo, C.; Statello, L.; Condorelli, A.G.; Battaglia, R.; Tamburello, L.; Barbagallo, D.; Di Pietro, C.; Purrello, M. (2015). Non-coding landscapes of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*.;21(41):11709-39.

- Ten Hoorn, S.; de Back, T.R.; Sommeijer, D.W.; Vermeulen, L. (2021). Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst.*: djab106.
- The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487 (7407) pp. 330-337.
- Vilar, E.; Tabernero, J. (2013). Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer. *Cancer Discov*, 3 (5) pp. 502-511
- Xie, X.; Tang, B.; Xiao, Y.F.; Xie, R.; Li, B-S.; Dong, H.; Zhou, J-Y.; Yang, S-M. (2016). Long non-coding RNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*. ;7:5226–5239.
- Xu, M.D.; Qi, P.; Du, X. (2014) Long non-coding RNAs in colorectal cancer: Implications for pathogenesis and clinical application. *Mod Pathol.*;27:1310–1320.
- Yang, Y.; Junjie, P.; Sanjun, C.; Ma, Y. (2017). Long non-coding RNAs in Colorectal Cancer: Progression and Future Directions. *J Cancer*. ;8(16):3212-3225.
- Yoshihara, K.; Shahmoradgoli, M.; Martínez, E.; Vegesna, R.; Hoom, K.; Torres-Garcia, W.; Treviño, V.; Shen, H.; Laird, P.W.; Levine, D.A.; Carter, S.L.; Getz, G.; Stemke-Hale, K.; Mills, G.B.; Verhaak, R.G.W. (2013). Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun*. 4:2612.
- Zhu, X.; Tian, X.; Ji, L.; Zhang, X.; Cao, Y.; Shen, C.; Hu, Y.; Wong, J.W.H.; Fang, J.Y.; Hong, J.; Chen, H. (2021). A tumor microenvironment specific gene expression signature predicts chemotherapy resistance in colorectal cancer patients. *NPJ Precis Oncol*. 12;5(1):7.

EXPRESIÓN DE HLA-G EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA

Moavro, Damián Ezequiel¹

Introducción

El cáncer de vejiga es una de las neoplasias urológicas más frecuentes, representando la quinta causa de muerte en orden de frecuencia en los países occidentales, después de las neoplasias de pulmón, próstata, mama, colon y recto (Kumar, Abbas y Aster, 2015). En Argentina afectan a casi el 3% de la población, predominantemente en el sexo masculino (Instituto Nacional del Cáncer, 2020). Cerca del 95% de los tumores de este órgano tienen un origen epitelial, siendo el más frecuente el denominado carcinoma urotelial o transicional (CT) (aproximadamente el 80% de los casos), seguido del adenocarcinoma y, en tercer lugar, el carcinoma epidermoide (Kumar, Abbas y Aster, 2015). Aunque el tamaño del tumor (T, según el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC)) no es el único determinante de pronós-

¹ Médico, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Especialista Jerarquizado en Anatomía Patológica, Colegio de Médicos de la Provincia de Buenos Aires. Profesor de Citología, Histología y Embriología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Médico de Planta y Coordinador Docente de la Residencia de Anatomía Patológica, Hospital Interzonal General de Agudos “General San Martín”, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

tico y tratamiento, actualmente, aquellas lesiones que no invaden la capa muscular de la vejiga, clasificados como T1, reciben tratamientos más conservadores mediante resección tumoral únicamente, con quimioterapia posterior o inmunoterapia intravesical con BCG (*bacillus Calmette-Guérin*). La invasión del músculo detrusor se clasifica como estadio T2 e implica, en la mayoría de los casos, una cistectomía radical (Consenso Nacional Inter-Sociedades para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Vejiga, 2013).

Un punto de control inmunitario (CI) recientemente descrito es la molécula no clásica de clase I del antígeno leucocitario humano G (HLA-G) (Carosella *et al.*, 2015). En un comienzo se identificó su implicancia en la tolerancia feto-materna y en el trasplante de tejidos (Rouas-Freiss *et al.*, 1997). Actualmente, la expresión del CI HLA-G se ha observado en la mayoría de los diferentes tumores analizados. Por ejemplo, se ha notificado una alta incidencia de expresión de HLA-G en el carcinoma renal de células claras (RCC) (Bukur *et al.*, 2003; Rouas-Freiss *et al.*, 2017; Tronik-Le Roux *et al.*, 2017). El papel del HLA-G como un CI, permitiría que el tumor escape al control del sistema inmunitario del huésped, lo que se ha demostrado en modelos murinos (Loumagne *et al.*, 2014). Además, el HLA-G tiene un efecto inhibitor más amplio que cualquier otro CI, ya que puede bloquear todos los pasos de las respuestas antitumorales al actuar sobre las células asesinas naturales (NK), los linfocitos B, los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos a través de la interacción directa con sus principales receptores ILT2 e ILT4 (Carosella *et al.*, 2015). Asimismo, se evidenció la transcripción del receptor ILT4 en células RCC (Rouas-Freiss *et al.*, 2017) y en cáncer de pulmón de células no pequeñas. En ambos casos, se demostró que el HLA-G promueve la progresión tumoral y la metástasis al aumentar los niveles del Factor de crecimiento endotelial vascular-C (VEGF-C) (Zhang *et al.*, 2015), el mejor caracterizado y el más eficientemente implicado en la linfangiogénesis y la metástasis linfática (Zheng, 2014; Raica, Jitariu y Cimpean, 2016; Cueni y Detmar, 2008). Se observaron resultados si-

milares cuando se analizaron las líneas celulares de RCC primarias, que también mostraron que la expresión del HLA-G se correlaciona con una mayor expresión de VEGF-C (García *et al.*, 2020). En cuanto al CT, Desgrandchamps *et al.* han demostrado una fuerte asociación entre la proporción de linfocitos T CD8+ILT2+ circulantes y el riesgo de recurrencia del carcinoma que no invade el músculo detrusor (Desgrandchamps *et al.*, 2018).

Objetivos

Con el objetivo de determinar la importancia de la expresión de este importante CI, nos propusimos explorar, por primera vez en Argentina, la expresión de HLA-G en la progresión del CT vesical, relacionando su grado de malignidad con la sobrevida del paciente.

Objetivo General

Explorar la expresión de HLA-G en el Carcinoma Transicional de vejiga en pacientes de un hospital público de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Objetivos Específicos

- Recibir la aprobación del trabajo de investigación por un comité de bioética e investigación.
- Obtener muestras de carcinomas de vejiga, de un Hospital Público.
- Establecer el diagnóstico de CT en cada uno de los casos obtenidos.
- Determinar el grado histológico y el estadio tumoral en cada una de las muestras.
- Inmunomarcarse HLA-G en la totalidad de las muestras.
- Agrupar las muestras de CT según la expresión de HLA-G observada en la inmunomarcación.

- Correlacionar el estadio tumoral y los grados histológicos con la inmunomarcación obtenida.

Hipótesis

La expresión de HLA-G en el Carcinoma Transicional está relacionada con el grado histológico y el estadio tumoral, por lo que la expresión de este marcador podría ser utilizada como indicador pronóstico de severidad clínica.

Materiales y Métodos

Pacientes

Se estudiaron 30 muestras de CT de vejiga obtenidas de resecciones transuretrales o cistectomías, correspondientes a pacientes atendidos en un hospital público de la ciudad de La Plata. El rango de edad de los pacientes fue de 49 a 71 años (media 58), en su mayoría hombres (21 casos). Además, se accedió a la historia clínica de cada paciente para determinar la presencia de factores de riesgo conocidos y la supervivencia de cada uno.

El protocolo de actuación para el manejo de las muestras, junto con el proyecto de investigación, fue aprobado por el Comité de Bioética y Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (COBIMED).

Procesamiento de muestras y diagnóstico

Las muestras se fijaron en formol al 10 % y se procesaron de forma rutinaria para el análisis histológico. De cada caso se realizaron dos cortes histológicos: uno para efectuar la caracterización histológica del CT y otro para realizar las técnicas de inmunohistoquímicas. El primer corte obtenido de cada una de las muestras se tiñó con hematoxilina-eosina y se realizó el diagnóstico neoplásico para cada una de ellas según la Clasificación de Tumores de la Organización Mundial de la Salud 2016 (Eble *et al.*, 2016). Finalmente, se estableció el nivel

de invasión tumoral en cada muestra según la estadificación AJCC/ UICC 2018 (TNM Classification of Malignant Tumours, 2018).

Inmunohistoquímica

Las secciones de cada una de las muestras utilizadas se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico de ratón, HLA-G Antibody (4H84) de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1:50 (Incubación 4°C durante la noche). A continuación, se utilizó el sistema Envision de Dako como sistema de detección y la 3'3'-diaminobencidina (DAB) de Sigma para la detección. Finalmente, se realizó una ligera tinción de contraste con Hematoxilina.

Resultados

Diagnóstico y estadificación de los casos

De los 30 casos analizados, 23 muestras (77%) corresponden a CT de alto grado (Figura 1), de las cuales 19 (83%) comprometen la capa muscular propia de la vejiga (pT2, según el estadio patológico). Siete de las muestras (el 23% restante del total) presentaron CT de bajo grado. En solo uno de estos últimos casos, el músculo detrusor de la vejiga estaba comprometido. En la tabla 1 se muestra la caracterización de cada uno de los casos estudiados.

En cuanto a la presencia de factores de riesgo, de las historias clínicas consultadas, solo 11 casos (37%) tenían antecedentes de tabaquismo: 9 de estos correspondían a CT de alto grado y 2 a CT de bajo grado (Figura 2). No se encontraron exposiciones ambientales o infecciones.

Inmunomarcación y sobrevida

En función del nivel de intensidad de la inmunomarcación obtenida para la expresión de HLA-G en células tumorales, todos los casos analizados se clasificaron en: leve, moderado e intenso.

Tabla 1. Caracterización de los casos.

Caso	Sexo	Edad	Carcinoma Urotelial	Nivel de Invasión	HLA-G	Supervivida
1	M	55	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
2	M	60	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
3	M	63	Alto grado	Muscular	+++	> 5 años
4	M	67	Alto grado	Muscular	+++	< 5 años
5	F	56	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
6	M	70	Alto grado	Muscular	+++	< 5 años
7	M	45	Bajo grado	Lamina Propia	+	> 5 años
8	F	66	Alto grado	Lamina Propia	+	> 5 años
9	F	90	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
10	F	52	Alto grado	Lamina Propia	+	> 5 años
11	M	65	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
12	M	66	Bajo grado	Lamina Propia	++	> 5 años
13	M	69	Alto grado	Muscular	++	< 5 años
14	M	56	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
15	M	54	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
16	M	51	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
17	M	49	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
18	M	67	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
19	M	65	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
20	F	59	Alto grado	Muscular	+++	< 5 años
21	M	51	Alto grado	Muscular	+++	> 5 años
22	M	49	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
23	F	58	Alto grado	Lamina Propia	-	> 5 años
24	F	55	Bajo grado	Lamina Propia	-	> 5 años
25	F	62	Bajo grado	Lamina Propia	+	> 5 años
26	M	68	Bajo grado	Lamina Propia	-	> 5 años
27	M	71	Bajo grado	Lamina Propia	-	> 5 años
28	F	55	Bajo grado	Muscular	+	> 5 años
29	M	50	Alto grado	Lamina Propia	+	> 5 años
30	M	49	Alto grado	Muscular	-	> 5 años

Referencias: Masculino, M; Femenino, F; expresión de HLA-G: negativa ; leve +; moderada ++; intensa +++.

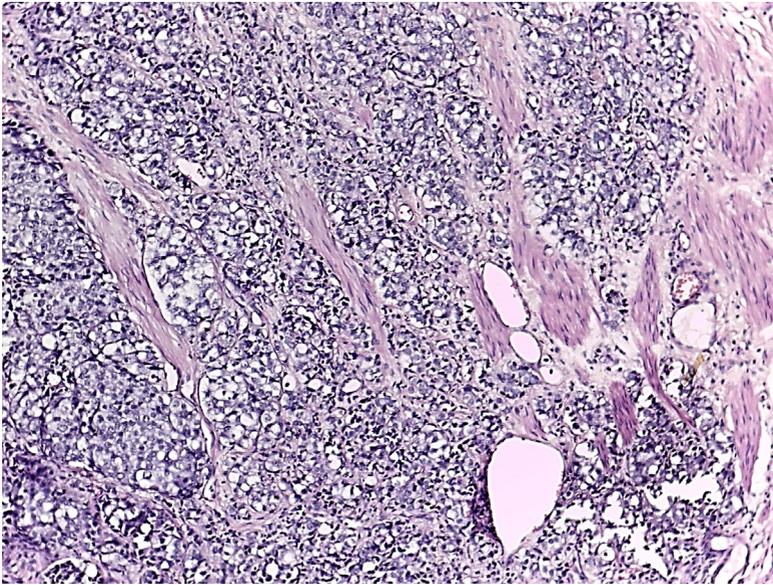


Figura 1. Carcinoma de células transicionales de alto grado con invasión de músculo detrusor. H-E, 10 X.

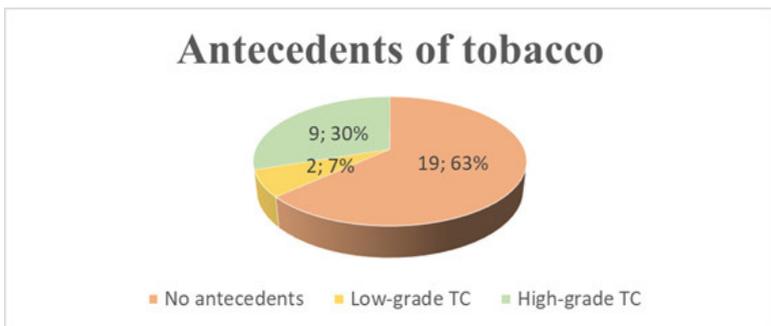


Figura 2. Proporción de pacientes con historial de cigarrillo.

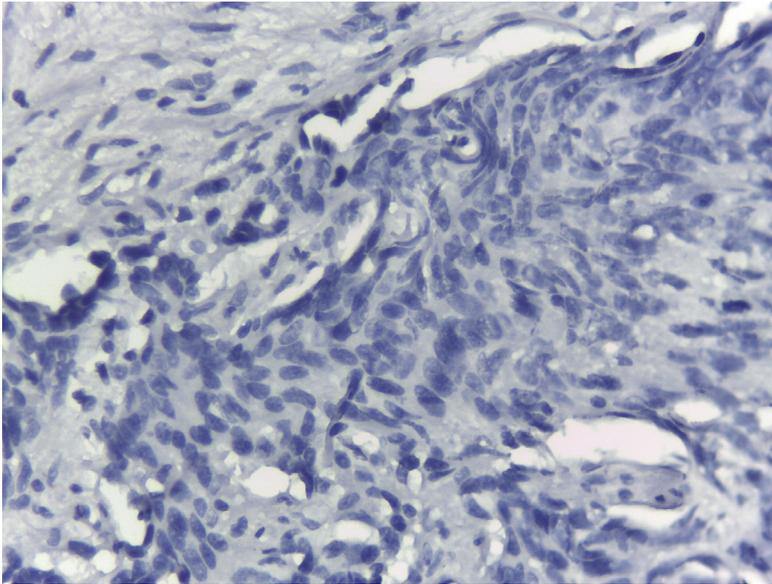


Figura 3. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación negativa para HLA-G. 40X.

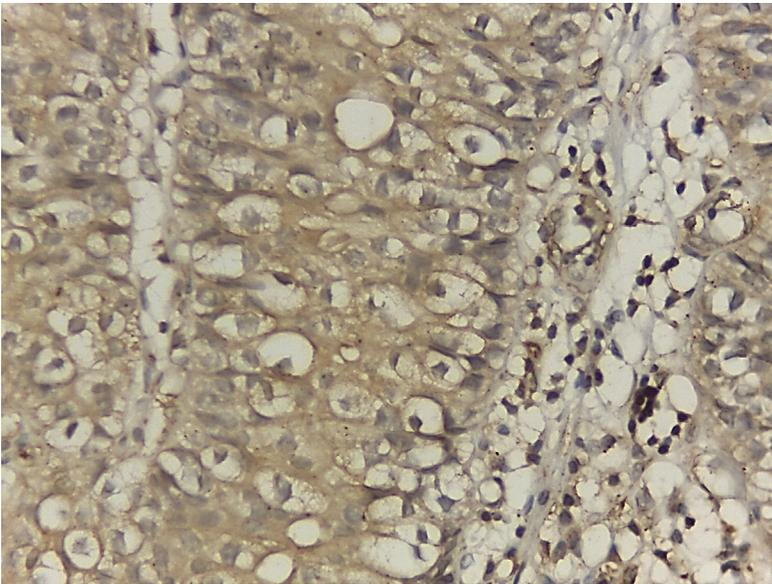


Figura 4. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación leve para HLA-G. 40X.

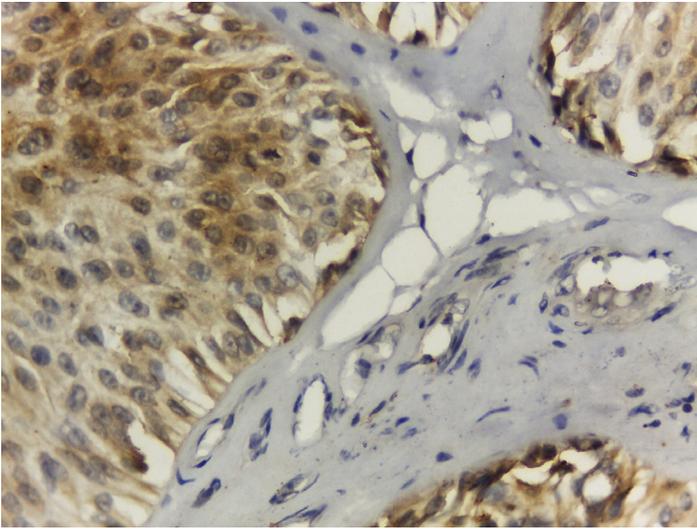


Figura 5. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación moderada para HLA-G. 40X.

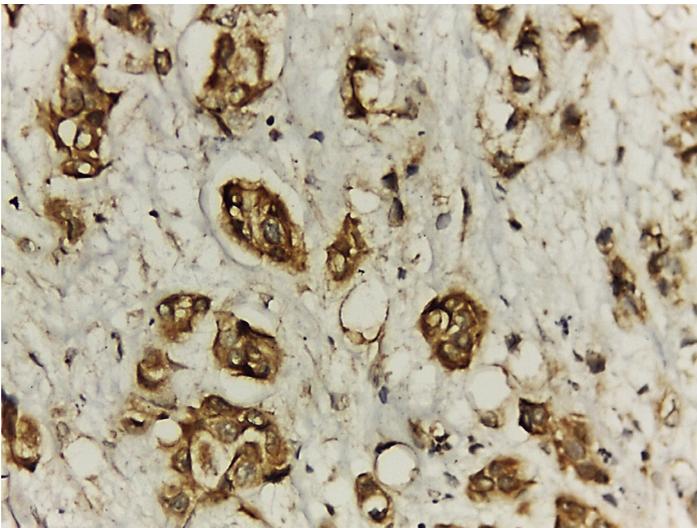


Figura 6. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación intensa para HLA-G. 40X.

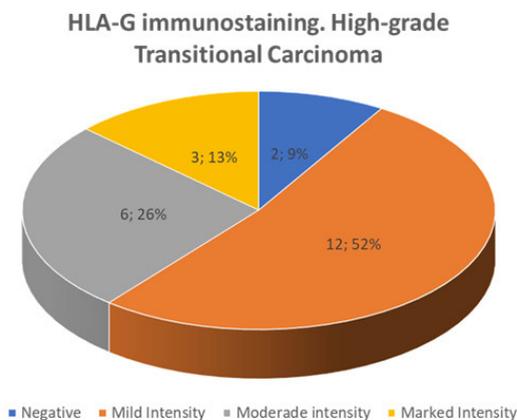


Figura 7. Proporción de muestras con inmunomarcación para HLA-G en Carcinoma de células transicionales de alto grado.

Del total de casos (23) de CT de alto grado, 21 muestras (91%) presentaron inmunomarcación para la expresión de HLA-G: 12 con intensidad leve, 6 con intensidad moderada y 3 con intensidad marcada, como se muestra en la Figura 7. Cuatro pacientes de este grupo (CT de alto grado) no habían superado los 5 años de supervivencia, de los cuales tres mostraron intensa positividad en la expresión de HLA-G. La intensidad fue moderada en el cuarto caso.

Las muestras con CT de bajo grado (7 casos) han mostrado inmunomarcación nula o leve para la expresión de HLA-G (Figura 8) y solo en uno de estos casos, el músculo detrusor estaba comprometido. Todos estos pacientes tuvieron una supervivencia superior a 5 años.

Conclusión

En Argentina, el cáncer de vejiga corresponde a casi el 3% de las neoplasias que afectan a la población, siendo la más frecuente el denominado carcinoma transicional (CT) (Instituto Nacional del Cáncer,

HLA-G immunostaining. Low-grade Transitional Carcinoma

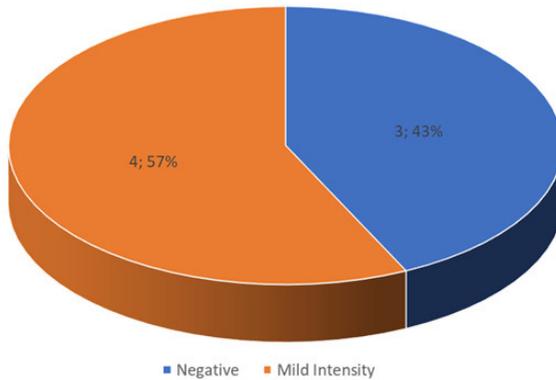


Figura 8. Proporción de muestras con inmunomarcación para HLA-G en Carcinoma de células transicionales de bajo grado.

2020). En la serie de casos analizada en este estudio, la edad media de las muestras obtenidas en el hospital público fue de 58 años, esta media se encuentra por debajo del rango de edad establecido por la Organización Mundial de la Salud en su clasificación de tumores del aparato urinario, de 65 a 71 años (Eble *et al.*, 2016). Una probable explicación para esto es que las muestras fueron obtenidas en un hospital público de alta complejidad que es un instituto de referencia regional, por lo que se atiende a un número importante de pacientes, muchos de los cuales son derivados de instituciones de menor complejidad. Además, estos pacientes suelen presentar estadios patológicos avanzados, lo que explica que la mayoría de los casos (20 de un total de 30) presenten CT de alto grado con compromiso de la capa muscular de la vejiga (estadio patológico T2).

Mecanismos que aún no están del todo claros provocan la expresión anormal de HLA-G en determinadas patologías, como algunas

neoplasias, como mecanismo para evadir el sistema inmunitario. En cuanto a la expresión de HLA-G en los casos de CT vesical analizados, 21 de los 23 casos de CT de alto grado (91%) han mostrado positividad para HLA-G, por encima de lo publicado en otras series (Desgrandchamps *et al.*, 2018). Sin embargo, los casos analizados en ese estudio previamente publicado corresponden exclusivamente a carcinomas que no invaden el músculo detrusor de la vejiga. En el presente trabajo, las muestras analizadas son en su mayoría de CT en estadios avanzados de la enfermedad (estadio T2). En este estudio, de las muestras que no involucran al músculo detrusor (10 en total), 6 presentaron positividad para la expresión de HLA-G y esta fue con intensidad leve. Es por ello, que para establecer una frecuencia de expresión regional de HLA-G, se debe aumentar el número de muestras de CT sin afectación de la muscular propia de la vejiga.

Se ha establecido que los pacientes con CT con afectación del músculo detrusor tienen una supervivencia a los 5 años menor que los que no la tienen, independientemente del grado histológico establecido (Eble *et al.*, 2016). En el presente trabajo, los pacientes con compromiso del detrusor (cuatro) tenían una expresión de HLA-G de moderada a fuerte, por lo que podemos confirmar que la expresión de este CI se correlaciona directamente con un mal pronóstico. Además, tres de los cuatro pacientes presentaban el consumo de tabaco como factor de riesgo añadido.

Todos los datos mencionados permiten afirmar que la expresión de HLA-G en células neoplásicas del CT vesical se asocia a una mayor agresividad de la lesión (considerando el nivel de invasión) y a una peor sobrevida (considerando un punto de corte de 5 años). Por lo tanto, sería de gran utilidad añadir esta inmunomarcación al panel de inmunohistoquímica utilizado en el diagnóstico de rutina de esta neoplasia.

Referencias bibliográficas

- Bukur, J.; Rebmann, V.; Grosse-Wilde, H.; Luboldt, H.; Ruebben, H.; Drexler, I.; Sutter, G.; Huber, C.; Seliger, B. (2003). Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 4107-4111.
- Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Tronik-Le Roux, D.; Moreau, P.; LeMaoult, J. (2015). HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol*, 33-144.
- Consenso Nacional Inter-Sociedades para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Vejiga. (2013). Argentina. Disponible en: https://www.sau-net.org/publicaciones/lineamientos-diagnostico-tratamiento/lineamientostumores/consenso_ca_vejiga_2013.pdf
- Cueni, L.N.; Detmar M. (2008). The Lymphatic System in Health and Disease. *Lymphat Res Biol*, 109-122.
- Desgrandchamps, F.; LeMaoult, J.; Goujon, A.; Riviere, A.; Rivero-Juarez, A.; Djouadou, M.; de Gouvello, A.; Dumont, C.; Wu, C-L.; Culine, S.; Verine, J.; Rouas-Freiss, N.; Hennequin, C.; Masson-Lecomte, A.; Carosella, E.D. (2018). Prediction of non-muscle-invasive bladder cancer recurrence by measurement of checkpoint HLAG's receptor ILT2 on peripheral CD8+ T cells. *Oncotarget*, 33160-33169.
- Eble J., Epstein J., Sauter G.; Sesterhenn, I. (2016 [2004]). *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, IARC Press, Lyon, Capítulo 2, 81-106.
- García, M.; Palma, M.B.; Verine, J.; Miriuka, S.; Inda, A.M.; Errecalde, A.L.; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.D.; Tronik-Le Roux, D. (2020). The immune-checkpoint HLA-G/ILT4 is involved in the regulation of VEGF expression in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 1-11.
- Instituto Nacional del Cáncer (2020), Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

- Kumar, V., Abbas, A.; Aster, J. (2015). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Capítulo 20, 961 – 969.
- Loumagne, L.; Baudhuin, J.; Favier, B.; Montespan, F.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N. (2014). In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance. *Int J Cancer*, 2107-2117.
- Raica, M.; Jitariu, A.A.; Cimpean Anca, M. (2016). Lymphangiogenesis and Anti-lymphangiogenesis in Cutaneous Melanoma. *Anti-cancer Res*, 4427-4436.
- Rouas-Freiss N., LeMaoult J., Verine J.; Tronik Le-Roux, D.; Culine, S.; Hennequin, C.; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.D. (2017). Intratumor heterogeneity of immune checkpoints in primary renal cell cancer: Focus on HLA-G/ILT2/ILT4. *Oncoimmunology*, 13420-13423.
- Rouas-Freiss, N.; Gonçalves, R.M.; Menier, C.; Dausset, J. Carosella, E.D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*, 11520-11525.
- Tronik-Le Roux, D.; Renard, J.; Vérine, J.; Renault, V.; Tubacher, E.; LeMaoult, J.; Rouas-Freiss, N.; Deleuze, J-F; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.D. (2017). Novel landscape of HLA-G isoforms expressed in clear cell renal cell carcinoma patients. *Mol Oncol*, 1561-1578.
- Union for International Cancer Control. (2018). TNM Classification of Malignant Tumours - 8th edition.
- Zhang, P.; Guo, X.; Li, J.; Yu, S.; Wang, L.; Jiang, G.; Yang, D.; Wei, Z.; Zhang, N.; Liu, J.; Sun, Y. (2015). Immunoglobulin-like transcript 4 promotes tumor progression and metastasis and up-regulates VEGF-C expression via ERK signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 13550-13563.
- Zheng, W.; Aspelund, A.; Alitalo, K. (2014). Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest*, 878–887.

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: EJEMPLO DE UNA VISIÓN INTEGRAL Y MICROBIOLÓGICA EN EL MARCO “UNA SALUD”. EL CASO DE *ENTEROCOCCUS SPP*¹

Schell, Celia María²

Resumen

El objetivo fue analizar y caracterizar la estructura poblacional de enterococos que causaban infecciones invasivas en pacientes de un hospital público argentino, coincidiendo con un período de 5 años de mayor recuperación de enterococos resistentes a antimicrobianos (2010-2014). La identificación de especies (pruebas bioquímicas y MALDI TOF-MS), la susceptibilidad antimicrobiana (difusión por discos y CIM) y la relación clonal (PFGE/MLST/BAPS) se determinaron de acuerdo con protocolos validados. La producción de β -lactamasa se determinó mediante prueba fenotípica y se confirmó mediante PCR/secuenciación. Los aislamientos se identificaron como *E. faecalis* y *E. faecium* (proporción 2:1). *E. faecalis* se agruparon en

1 Parte de los resultados presentados en el seminario fueron publicados en: Schell, CM; Tedim, AP; Rodríguez-Baños, M; Sparo, MD; Lissarrague, S; Basualdo, JA; Coque, TM. Detection of β -Lactamase-Producing *Enterococcus faecalis* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates in Human Invasive Infections in the Public Hospital of Tandil, Argentina. *Pathogens* 2020, 9, 142.

2 Bioquímica. Universidad Nacional del Litoral. Dra. en Ciencias Médicas y Especialista en Docencia Universitaria. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Diplomada en Dirección y Gestión Universitaria. Universidad de Granada, España. Profesora de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

25 tipos clonales (ST9/ST179/ST236/ST281/ST388/ST604/ST720), y varios presentaron alto nivel de resistencia a gentamicina/estreptomina (ANRGE). Se detectó un clon de secuencia tipo (ST): ST9 (bla+/alto nivel de resistencia a gentamicina) en pacientes de diferentes salas durante 2014. *E. faecium* se agrupó en 10 tipos clonales (ST25/ST18/ST19/ST52/ST792). Cinco *E. faecium* fueron resistentes a vancomicina (tres vanA y dos vanB). La recuperación de un bla+/ST9-*E. faecalis*, clon similar al descrito a fines de la década de 1980 en Argentina sugiere la posibilidad de un reservorio oculto local. Estos resultados reflejan la relevancia de la epidemiología local para comprender la estructura de la población de esta bacteria, así como la aparición y propagación de resistencia antimicrobiana en los linajes clonales predominantes de enterococos.

Introducción

Las bacterias que pertenecen al género *Enterococcus* son cocos Gram positivos (células esféricas), integrantes del microbioma gastrointestinal habitual del hombre y animales (Lebreton, Willems y Gimore, 2014). Fenotípicamente son anaerobios facultativos, catalasa negativos y pueden observarse al microscopio óptico generalmente agrupados de a pares, formando cortas cadenas o ubicados aisladamente. Por su versatilidad biológica y al ser eliminados por materia fecal, pueden habitar diversos nichos ecológicos de la naturaleza; como cursos de agua, plantas, insectos, vegetales, alimentos de origen animal y objetos inanimados intrahospitalarios.

Enterococcus faecalis (80-90 %) y *Enterococcus faecium* (10 %) son las especies aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas provenientes de infecciones humanas documentadas (Arias y Murray, 2012).

Enterococcus gallinarum, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus flavescens* y *Enterococcus durans*, también pueden

producir patología infecciosa en el ser humano. Sin embargo, su frecuencia de aislamiento a partir de muestras clínicas es mucho menor (Narciso-Schiavon *et al.*, 2015).

La ubicación de estas bacterias en el tracto gastrointestinal y genitourinario del hombre (cepas endógenas), es una condición que facilita la capacidad para colonizar, persistir y continuar con el mecanismo de patogénesis microbiana (Lebreton, Willems y Gilmore, 2014). Sin embargo, también puede producirse una infección por cepas exógenas adaptadas al nicho hospitalario, en algún lugar anatómico del paciente, como resultado de la colonización y la multiplicación excesiva de enterococos resistentes.

Los *Enterococcus* poseen resistencia intrínseca a diversos antimicrobianos (ATM) y esta particularidad, acota las opciones terapéuticas disponibles para su tratamiento y erradicación. El tratamiento de las infecciones graves por enterococos frecuentemente se ve perjudicado por la resistencia intrínseca y/o adquirida a los ATM de primera línea, es decir, los activos contra la pared celular (betalactámicos o glucopéptidos) y los aminoglucósidos, que se combinan para lograr un efecto bactericida (Moreira *et al.*, 2016; Mercurio *et al.*, 2018). La resistencia a estas opciones terapéuticas se ha informado ampliamente en los países occidentales, pero la información de otros lugares, incluida Argentina, aún es escasa y proviene de estudios centrados en la resistencia a los glucopéptidos (Guzman Prieto *et al.*, 2016; Werner *et al.*, 2008; Togneri *et al.*, 2005; Lopardo *et al.*, 2008); descripciones tempranas de mecanismos emergentes de resistencia (producción de β -lactamasa) (Murray y Mederski-Samaroj, 1983); o estudios transversales de vigilancia que solo incluyen algunos aislamientos de diferentes ubicaciones geográficas³ (Pfaller *et al.*, 2019).

Respecto a la resistencia intrínseca a algunos ATM β -lactámicos como las cefalosporinas y los carbapenémicos, la resistencia a penicilina se adquiere por mutaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP) o, con menos frecuencia, por la producción de una β -lactamasa

³ Para acceder a más información, ingresar a <https://resistancemap.cddep.org/>

(Conceição *et al.*, 2014). La resistencia a las aminopenicilinas es muy común en *E. faecium* y se debe principalmente a mutaciones en la PBP5 (Novaris *et al.*, 2016) y, esporádicamente, a la producción de β -lactamasa (Sarti *et al.*, 2012). Aunque la mayoría de los aislamientos de *E. faecalis* son susceptibles a la penicilina, se han notificado *E. faecalis* resistentes a la penicilina y sensibles a ampicilina (PRASEF) desde finales de la década de 1980 en diferentes países, incluida Argentina (Sarti *et al.*, 2012; Gagetti *et al.*, 2019). Hasta la fecha, PRASEF puede resultar de la producción de β -lactamasa o mutaciones en la PBP4 (Conceição *et al.*, 2014). La resistencia a los glucopéptidos está mediada por una plétora de determinantes genéticos, siendo los genotipos *vanA* (Tn1546) y *vanB* (Tn5382/Tn1547) los más predominantes (Werner *et al.*, 2008). El primer enterococo resistente a vancomicina (ERV) reportado en América Latina fue aislado en Mendoza, Argentina, en 1996 de un paciente masculino de 7 años tratado con diferentes ATM y fue identificado como *E. faecium* (*vanA*) (Marín *et al.*, 1998). Luego de este caso esporádico, en varios hospitales argentinos se detectó *E. faecium* portador de *vanA* o *vanB* en pacientes colonizados o infectados (Togneri *et al.*, 2005; Lopardo *et al.*, 2008; Corso *et al.*, 2007). La mayoría de estos ERV fueron *E. faecium* (*vanA*) y, esporádicamente, *E. faecalis* y *Enterococcus gallinarum* (Corso *et al.*, 2007; Faccone *et al.*, 2010).

La resistencia de alto nivel a gentamicina (RANG) en enterococos se describió por primera vez en 1979 en Francia y, a fines de la década de 1980, en diferentes países, incluida Argentina, que a menudo se asocia con *E. faecalis* productores de β -lactamasa (Murray, 1992; Hodel-Christian y Murray, 1992). Datos recientes en el sitio del CDDEP⁴ revelaron que los aislamientos de *E. faecium* obtenidos a partir de infecciones invasivas (bacteriemia y meningitis) fueron comúnmente resistentes a ampicilina (>75 % - 80 %) y a vancomicina (60 % - 75 %), mientras que los aislamientos de *E. faecalis* aislados de las mismas

4 <https://resistancemap.cddep.org/>

infecciones, rara vez fueron resistentes a los ATM activos contra la pared celular en Argentina.

Adicionalmente, la caracterización de la estructura poblacional de enterococos en diferentes hospitales del mundo ha sido muy bien estudiada (Coque *et al.*, 2005; Tedim *et al.*, 2016; Kuo *et al.*, 2018). Sin embargo, en Argentina, la caracterización del ST de cepas de enterococos aislados de entornos hospitalarios no es muy conocida. Sólo escasos trabajos han comunicado la detección del ST17, confirmando la circulación de clones A y B pertenecientes al Complejo Clonal (CC) 17 para la especie *E. faecium*, lo cual indica que este CC es el principal responsable de la emergencia y diseminación de *E. faecium* vancomicina resistentes (EFMVR) en nuestro país (Faccone *et al.*, 2010).

Caracterizar las cepas y el resistoma de cada institución de salud, es de elevada importancia ya que permite modificar y/o adecuar medidas de Bioseguridad vinculadas al uso racional y prudente de los ATM en línea con los objetivos de la nueva Ley Nacional de Prevención y control de la Resistencia a los ATM (Ley N° 27680).

Además, géneros como el descripto sirven como puntos de recolección y distribución de elementos genéticos móviles, transmitiendo una variedad de resistencias a los ATM a especies grampositivas y gramnegativas, incluida la transmisión de resistencia a vancomicina de los enterococos a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Courvalin, 1994; Weigel *et al.*, 2003).

El Hospital Municipal Ramón Santamarina (HMRS) de la ciudad de Tandil, Buenos Aires, es un hospital público de tamaño mediano que cubre atenciones de patologías agudas y crónicas de poblaciones urbanas y rurales del partido de Tandil y alrededores. Durante el periodo comprendido entre 2010 a 2014, se elevó el aislamiento de cepas de *Enterococcus spp.* con resistencia antimicrobiana en dicho nosocomio.

Dada esta situación, se diseñó un estudio cuyo objetivo fue analizar y caracterizar la estructura poblacional de enterococos que causaban infecciones invasivas en pacientes internados en el HMRS,

coincidiendo con un período de 5 años de mayor recuperación de enterococos resistentes a ATM.

Hipótesis

Por el uso intensivo de ATM dentro y fuera del ambiente hospitalario, en el HMRS, perteneciente al Sistema Integrado de Salud Pública del Municipio de Tandil (SISPMT), Buenos Aires, se aíslan especies multirresistentes del género *Enterococcus* de muestras clínicas obtenidas por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas.

Objetivo general

Analizar y caracterizar la estructura poblacional de cepas de *Enterococcus spp.* causantes de infecciones invasivas en pacientes de un hospital público argentino durante el período 2010-2014.

Materiales y Métodos

Área y período de estudio: El HMRS integra juntamente con el Hospital de Niños Dr. Debilio Blanco Villegas (DBV) y el Hospital Enrique Larreta de la localidad de María Ignacia Vela, el SISPMT, Buenos Aires, República Argentina. Se encuentra ubicado en el sudeste de la provincia homónima y depende de la Subsecretaría de Salud de la Municipalidad de Tandil. Es un organismo descentralizado, de mediana complejidad, incluido en el régimen de hospitales públicos de autogestión. El HMRS posee una gran zona de influencia que incluye pacientes provenientes de otras localidades de la provincia como Ayacucho, Rauch, Lobería, Necochea y zonas cercanas a 80 y 90 km a la redonda. En 2013 se realizaron un total de 19.899 consultas en todos sus servicios y se registraron 5.348 internaciones. En el 2014, fueron registradas 22.001 consultas.

Diseño del estudio: El período de estudio de este proyecto estuvo comprendido entre marzo de 2012 y diciembre de 2016. El diseño de

investigación fue observacional, descriptivo, retrospectivo y de corte transversal.

Unidad de observación: Las cepas de *Enterococcus spp.* en primera instancia fueron recuperadas y aisladas de manera retrospectiva, a partir de una colección de cepas de esta bacteria conservadas en freezer (-20 °C) en el Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP), FCM-UNLP. Todas estas cepas (n=16) pertenecían al cepario del CUDEMyP y correspondían a aislados provenientes de muestras clínicas obtenidas por punción (unidad de análisis) de pacientes internados en HMRS durante el año/cohorte 2010. Posteriormente, se recolectaron prospectivamente, durante 2013 y 2014, n=47 cepas de *Enterococcus spp.* (segunda cohorte) de muestras obtenidas por punción de pacientes internados por presentar diagnóstico de infección invasiva. La población total quedó conformada por N=63 cepas.

Identificación de cepas de *Enterococcus spp.* por pruebas bioquímicas y espectrometría de masas (MALDI TOF-MS): La caracterización fenotípica se realizó por pruebas bioquímicas convencionales a nivel de género y especie en cada colonia presuntiva de enterococos, que desarrolló en agar bilis esculina azida y en los demás medios de cultivos, a 35 °C por 24 h. La confirmación fue por MALDI TOF-MS Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Determinación de la relación clonal de los aislamientos por electroforesis de campo pulsado (PFGE): La relación clonal para evaluar la vinculación epidemiológica de las cepas de enterococos, productoras de infecciones invasivas, fue determinada analizando los pulso-tipos obtenidos por PFGE (Electroforesis de Campo pulsado) según protocolo estandarizado.

Caracterización genética de cepas seleccionadas de *Enterococcus* spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y determinación de la estructura genética poblacional: Para este estudio se seleccionó estratégicamente a un subconjunto de aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium*, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por electroforesis de campo pulsado. También fueron seleccionadas cepas que presentaron patrones de resistencia diferentes, siendo del mismo clon, de modo tal de inferir conclusiones vinculadas con los resultados obtenidos por MLST y PFGE. Para determinar el Secuencia tipo (ST) de cada cepa seleccionada, se colocó el número obtenido de cada perfil alélico detectado por amplificación y secuenciación de los siete genes en el esquema de MLST de cada bacteria.

Determinación del perfil de resistencia in vitro frente a los ATM de importancia clínica mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM): El perfil de resistencia a los ATM se determinó de manera cualitativa utilizando el método de difusión por discos o Kirby Bauer, y de manera cuantitativa por método epsilométrico (E-test), según los instructivos de las guías establecidas por CLSI, 2016.

Detección fenotípica de producción de β -lactamasa y secuenciación del gen: La producción de β -lactamasa se investigó mediante el método del disco de nitrocefina (Cefinase discs) utilizando un kit comercial (Becton Dickinson, Argentina SRL.). Para la secuenciación se siguió el protocolo de McBride *et al.* (2007).

Determinación de la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica: Sobre la base de las secuencias de los genes de resistencia vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, etc.; fueron seleccionados cebadores específicos de cada gen para amplificar por PCR, los fragmentos internos, siguiendo protocolos estandarizados.

Análisis estadístico de los resultados: Medidas de estadística descriptiva, de verificación de diferencias (Chi (χ^2) cuadrado, pruebas no paramétricas, con un nivel de significancia del 95 %), fueron utilizadas para el análisis y la expresión de los resultados. Hallazgos de valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos para las pruebas estadísticas aplicadas.

Aprobación ética: Los registros de los pacientes se obtuvieron en cumplimiento de la Ley Nacional N° 25.326 art. 11 de “Protección de Datos Personales” y la Ley Nacional N° 26529/10 “Derechos del Paciente, Historia Clínica y Consentimiento Informado” de Argentina, en línea con la declaración de Helsinki. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Investigación del HMRS.

Resultados

Antecedentes epidemiológicos de las cepas aisladas de infecciones invasivas humanas en el HMRS

En esta investigación, la población quedó conformada por N=63 cepas de *Enterococcus spp.* n=44 *E. faecalis* y n=19 *E. faecium* fueron detectadas.

Todas las cepas fueron identificadas con pruebas bioquímicas convencionales y confirmadas por MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* se aislaron de siete muestras clínicas (tres fluidos peritoneales, dos abscesos hepáticos, un fluido abdominal, y un líquido sinovial). La edad de los pacientes osciló entre 16 y 92 años ($59 \pm 18,8$ años, 70% > 50 años), la mayoría con enfermedad de base (49%) y antecedentes de exposición a ATM (80%), principalmente a ciprofloxacina (23,6%), cefalexina (18,2%) y ceftriaxona (14,5%). La tasa de mortalidad fue del 27,3%.

E. faecalis: Aproximadamente la mitad de los aislamientos de *E. faecalis* (47,7%) fueron sensibles a todos los ATM probados. Se detectó

RANG (43,2%), a estreptomycin (22,7%) a ambas (13,6%) y resistencia a fluoroquinolonas (20,4%, ciprofloxacina y levofloxacina), penicilina (11,4%) y cloranfenicol (2,3%). La producción de β -lactamasa se infirió para los cinco aislados de PRASEF en función del aumento de 5 mm en el diámetro de inhibición de ampicilina-sulbactam en comparación con ampicilina (27), prueba de nitrocefina positiva y la identificación del gen de β -lactamasa de clase A, que confiere resistencia a las aminopenicilinas (número de acceso de GenBank U43087.1). Los aislamientos PRASEF exhibieron el mismo tipo PFGE, EFC-2, y se clasificaron como ST9. El resto de las cepas *E. faecalis* se agrupó en 24 tipos diferentes de PFGE. Además de EFC-2, los tipos de PFGE más comunes fueron EFC-7, EFC-16 y EFC-3, que corresponden a ST179, ST281 y ST720, respectivamente. ST720 fue un nuevo ST de *E. faecalis* descrito aquí por primera vez.

***E. faecium*:** Los aislados de *E. faecium* fueron resistentes a penicilina (47,4%), ampicilina y ampicilina/sulbactam, vancomicina (26,3% cada uno), teicoplanina, levofloxacina y quinupristin-dalfopristin (15,8% cada uno), ciprofloxacina y presentaron RANG (10,5%). Todas las cepas de *E. faecium* fueron sensibles a linezolid, tigeciclina y cloranfenicol. Tres cepas fueron multirresistentes (Magiorakos *et al.*, 2012). Las cepas de *E. faecium* se agruparon en 10 tipos diferentes de PFGE, siendo predominantes: EFM-1, EFM-2 y EFM-4. EFM-1 y EFM-4 pertenecían a ST25-BAPS 2.3 y ST52-BAPS 7, respectivamente. En este estudio se detectaron cinco cepas EFMVR (tres vanA y dos vanB). Dos aislados de vanA tenían diferentes tipos de PFGE (EFM-7 y EFM-9), pero ambos pertenecían a BAPS 3.1-ST792. La otra cepa vanA y las dos cepas vanB mostraron el mismo tipo PFGE, EFM-1, y se identificaron como BAPS 2.3-ST25. Las dos cepas vanB se aislaron de muestras de sangre y fluidos abdominales de pacientes con infecciones del torrente sanguíneo e intraabdominales documentadas en las salas de cirugía y UTI (unidad terapia intensiva) en 2013 y 2014.

Discusión

Este informe documenta la presencia de complejos clonales relevantes de alto riesgo de *E. faecalis* y *E. faecium* (Guzmán Prieto *et al.*, 2016), capaces de adquirir y diseminar genes resistentes a los ATM de primera línea. El clon ST9-PRASEF (bla+, RANG) de *E. faecalis* identificado en este estudio, representa uno de los pocos bla+/*E. faecalis* descriptos hasta la fecha, la mayoría de ellos documentados a fines de la década de 1980 en EE. UU., Líbano, Canadá y Argentina (Nallapareddy *et al.*, 2002). La aparente relación entre los aislamientos de ST9-bla+ descriptos aquí y los reportados en otro hospital de Buenos Aires en 1989, ambos con RANG, sugieren que este clon podría haber estado circulando en nuestro medio desde fines de la década de 1980. Clones endémicos de *E. faecalis* con mecanismos de resistencia poco frecuentes, como la producción de β -lactamasa o resistencia a vancomicina, se han descrito previamente en regiones específicas de los EE. UU., ya sea debido a un clon epidémico (ST6-bla+) (Murray, 1992; Hayakawa *et al.*, 2011) o un plásmido epidémico (Inc18-vanA) (Teddim *et al.*, 2015). Hasta la fecha, no se comprende bien por qué estas cepas resistentes a los ATM permanecen aparentemente confinadas en regiones específicas. La presencia de otros ST de *E. faecalis* como ST179, ST388 y ST720 (con RANG) en más de un paciente en diferentes salas, refleja la transmisibilidad de varios clones en el hospital bajo estudio. Respecto a cepas de *E. faecium* caracterizadas en esta investigación, algunas de ellas, no pertenecían a los grupos clonales predominantes en la mayoría de los hospitales del mundo, pertenecían a subgrupos BAPS 3.3a (ST18 y ST17) o 2.1a (ST117, ST203 y ST80) (Gagetti *et al.*, 2019; Tedim *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2016). Llama la atención la detección de clones pertenecientes a otros grupos filogenéticos, a menudo asociados a animales y capaces de adquirir diferentes rasgos de resistencia como BAPS 3.1-ST792 (2 vanA) o BAPS 2.3-ST25 (2 vanB y 1 vanA) (Tedim *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2016; Pourcel *et al.*, 2017). Esta diversidad clonal explica la baja ocurrencia de *E. faecium*

resistente a ampicilina encontrada en nuestro estudio en comparación con lo reportado en otras series (26,3% vs >85%)⁵ (Corso *et al.*, 2007; Faccone *et al.*, 2010; Osuka *et al.*, 2016). Por otro lado, la diversidad genética de *E. faecalis* y *E. faecium* capaces de adquirir genes que codifican ANRGE, detectada en este estudio, muestra algunos clones con potencial zoonótico, que podrían facilitar la propagación de estos genes entre diferentes huéspedes, como se ha informado en diferentes lugares geográficos (Pourcel *et al.*, 2017; Osuka *et al.*, 2016; Gawryszewska *et al.*, 2016).

A pesar de la limitada muestra analizada, datos epidemiológicos, como la diversidad de presentaciones clínicas la edad/sexo de los pacientes y los factores de riesgo para adquirir infecciones por enterococos, concuerdan con otros estudios (Guzman Prieto *et al.*, 2016, Pourcel *et al.*, 2017). En resumen, la epidemiología de los enterococos en un hospital de tamaño mediano de América del Sur, durante una situación sin brote arrojó información interesante para la salud pública. La persistencia de clones resistentes emblemáticos e inusuales como *E. faecalis* ST9 (bla+, RANG) sugiere la presencia de reservorios ocultos de *E. faecalis* resistentes, en diferentes áreas geográficas. Además, destaca la importancia de definir la estructura poblacional de los enterococos en diferentes lugares para comprender la influencia de los factores sociodemográficos en la diversidad clonal de éstos y, por tanto, en la aparición y transmisión de la resistencia a los ATM.

Conclusión

El interés del estudio radicó en el valor para describir la estructura poblacional de enterococos durante un período de recuperación creciente de aislamientos multirresistentes en un área geográfica con baja prevalencia de enterococos resistentes a ATM de primera línea, pero donde se encontraron/detectaron mecanismos emblemáticos de resistencia antimicrobiana.

5 <https://resistancemap.cddep.org/CountryPage.php?countryId=65&país=Argentina>

Referencias bibliográficas

- Arias, C. A.; Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
- Conceição, N.; Pinheiro da Silva, L. E. P.; da Costa Darini, A. L.; Pitondo-Silva, A.; Gonçalves de Oliveira, A. (2014). Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible Enterococcus faecalis of hospital origin: pbp4 gene polymorphism and genetic diversity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 289-295.
- Coque, T. M.; Willems, R. J.; Fortún, J.; Top, J.; Diz, S.; Loza, E.; Cantón, R.; Baquero, F. (2005). Population structure of Enterococcus faecium causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2693-2700.
- Corso, A. C.; Gagetti, P. S.; Rodríguez, M. M.; Melano, R.G.; Ceriana, P.G.; Faccone, D.F.; Galas, M.F.; VRE Argentinean Collaborative Group. (2007). Molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 69-75.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(7), 1447-1451.
- Faccone, D.; Abel, F.; Lopez Ruiti, P.; Gagetti, P.; Corso, A. (2010). Diseminación de Enterococcus faecium con resistencia a glicopeptidos (VREFM) del complejo clonal 17 en Argentina. In Proceedings of the XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica—SADEBAC, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental, Buenos Aires, Argentina, 17-20 octubre 2010.
- Freitas, A. R.; Tedim, A. P.; Francia, M. V.; Jensen, L.B.; Novais, C.; Peixe, L.; Sánchez- Valenzuela, A.; Sundsfjord, A.; Hegstad, K.; Werner, G.; Sadowy, E.; Hammerum, A.M.; Garcia-Migura, L.; Willems, R.J.; Baquero, F.; Coque, T.M. (2016). Multilevel popula-

- tion genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3351-3366.
- Gagetti, P.; Bonfiglio, L.; García Gabarrot, G.; Kaufman, S.; Molle-rach, M.; Vigliarolo, L.; von Specht, M.; Toresani, I.; Lopardo, H.A. (2019). Resistencia a los β -lactámicos en enterococos. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), 179-183.
- Gawryszewska, I.; Żabicka, D.; Bojarska, K.; Malinowska, K.; Hry-niewicz, W.; Sadowy, E. (2016). Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(5), 847-856.
- Guzman Prieto, A. M.; van Schaik, W.; Rogers, M. R.; Coque, T.M.; Baquero, F.; Corander, J.; Willems, R.J.L. (2016). Global emergen-ce and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: at-tack of the clones?, *Frontiers in Microbiology*, 7, 788.
- Hayakawa, K.; Marchaim, D.; Vidailac, C.; Lephart, P.; Pogue, J.M.; Sunkara, B.; Kotra, H.; Hasan, A.; Shango, M.; Yerramalla, Y.; Osunlana, A.M.; Chopra, T.; Dhar, S.; Salimnia, H.; Rybak, M.J.; Kaye, K.S. (2011). Growing prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in the region with the highest prevalence of vancomycin-resistant. *Staphylococcus aureus. Infection Control & Hospital Epidemiology*, 32(9), 922-924.
- Hodel-Christian, S. L.; Murray, B. E. (1992). Comparison of the gen-tamicin resistance transposon Tn5281 with regions encoding gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolates from di-verse geographic locations. *Antimicrobial Agents and Chemothe-rapy*, 36(10), 2259-2264.
- Kuo, A- J.; Shu, J-C.; Liu, T- P.; Lu, J-J.; Lee, M-H.; Wu, T-S.; Su, L-H.; Wu, T-L. (2018). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at a university hospital in Taiwan, 2002-2015: fluctuation of ge-netic populations and emergence of a new structure type of the Tn1546-like element. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(6), 821-828.

- Lebreton, F.; Willems, R. J.; Gilmore, M. S. (2014). Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. [Internet].
- Lopardo, H.; Blanco, A.; Carbonaro, M.; Ruvinsky, S.; Andi3n, E.; Venuta, M.E.; Corso, A.; Gagetti, P.; Bologna, R. (2008). Impacto de 10 a3os de vigilancia de colonizaci3n con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en un hospital pedi3trico de alta complejidad. *Med. Infant*, 114-120.
- Magiorakos, A. P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. (2012). Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- Mar3n, M. E.; Mera, J. R.; Arduino, R. C.; Correa, A.P.; Coque, T.M.; Stamboulian, D.; Murray, B.E. (1998). First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 235-236.
- McBride, S. M.; Fischetti, V. A.; LeBlanc, D. J.; Moellering, R.C.; Gilmore, M.S. (2007). *Genetic diversity among Enterococcus faecalis*. *PloS One*, 2(7), e582.
- Mercurio, N. J.; Davis, S. L.; Zervos, M. J.; Herc, E. S. (2018). Combating resistant enterococcal infections: a pharmacotherapy review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(9), 979-992.
- Moreira, N. B.; Nastro, M.; Vay, C.; Famiglietti, A.; Rodr3guez, C.H. (2016). Actividad in vitro de ampicilina-ceftriaxona frente a aislamientos de *Enterococcus faecalis* recuperados de infecciones invasivas. *Revista Argentina de Microbiolog3a*, 48(1), 57-61.
- Murray, B. E. (1992). Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(11), 2355-2359.

- Murray, B. E.; Mederski-Samaroj, B. (1983). Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *The Journal of clinical investigation*, 72(3), 1168-1171.
- Nallapareddy, S. R.; Duh, R-W; Singh, K. V.; Murray, B.E. (2002). Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 868-876.
- Narciso-Schiavon, J. L.; Borgonovo, A.; Marques, P. C.; Tonon, D.; Tiemi Oshiro Bansho, E.; Maggi, D.C.; Buzaglo Dantas Corrêa, E.; de Lucca Schiavon, L. (2015). *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* as causative agents of spontaneous bacterial peritonitis. *Annals of Hepatology*, 14(2), 270-272.
- Novais, C.; Tedim, A. P.; Lanza, V. F.; Freitas, A.R.; Silveira, E.; Escada, R.; Roberts, A.P.; Al-Haroni, M.; Baquero, F.; Peixe, L.; Coque, T.M. (2016). Co-diversification of *Enterococcus faecium* core genomes and PBP5: evidence of pbp5 horizontal transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1581.
- Osuka, H.; Nakajima, J.; Oishi, T.; Funayama, Y.; Ebihara, T.; Ishikawa, H.; Sato, K.; Koganemaru, H.; Hitomi, S. (2016). High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(1), 61-63.
- Pfaller, M. A.; Cormican, M.; Flamm, R. K.; Mendes, R.E.; Jones, R.N. (2019). Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 6, No. Supplement_1, pp. S54-S62). US: Oxford University Press.
- Pourcel, N. G.; Sparo, M. D.; Corso, A.; Delpech, G.; Gagetti, P.S.; de Luca, M.M.; Bernstein, J. C.; Schell, C. M. B.; Lisarrague, S.; Basualdo Farjat, J. A. (2017). Molecular genetic profiling of clinical

- and foodborne strains of enterococci with high level resistance to gentamicin and vancomycin. *Clinical Microbiology: Open Access*, 6. Protocolo de trabajo Red WHONET Argentina.
- Sarti, M.; Campanile, F.; Sabia, C.; Santagati, M.; Gargiulo, R.; Stefani, S. (2012). Polyclonal diffusion of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(1), 169-172.
- Tedim, A. P.; Ruiz-Garbajosa, P.; Corander, J.; Rodríguez, C.M.; Cantón, R.; Willems, R.J.; Baquero, F.; Coque, T.M. (2015). Population biology of 13 intestinal *Enterococcus* isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1820-1831.
- Tedim, A. P.; Ruíz-Garbajosa, P.; Rodríguez, M. C.; Rodríguez- Baños, M.; Lanza, V.F.; Derdoy, L.; Cárdenas Zurita, G.; Loza, E.; Cantón, R.; Baquero, F.; Coque, T.M. (2016). Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995–2015) in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(1), 48-55.
- Togneri, A. M.; Corso, A.; González, J.; Lopardo, H.; Podestá, L.B.; Galletti, P.; Pérez, M.; Rodríguez, V.; Rodríguez, M.; Ríos, L.; Dinerstein, E. (2005). Análisis clínico-epidemiológico de la portación intestinal de enterococos resistentes a vancomicina en una unidad de terapia intensiva. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1), 26-33.
- Weigel, L. M.; Clewell, D. B.; Gill, S. R.; Clark, N.C.; McDougal, L.K.; Flannagan, S.E.; Kolonay, J.F.; Shetty, J.; Killgore, G.E.; Tenover, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 302(5650), 1569-1571.
- Werner, G.; Coque, T. M.; Hammerum, A. M.; Hope, R.; Hryniewicz, W.; Johnson, A.; Klare, I.; Kristinsson, K.G.; Leclercq, R.; Lester, C.H.; Lillie, M.; Novais, C.; Olsson-Liljequist, B.; Peixe, L.V.; Sadowy, E.; Simonsen, G.S.; Top, J.; Vuopio-Varkila, J.; Willems, R.J.; Witte, W.; Woodford, N. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro surveillance*, 13(47), 19046.

Stagnaro Plâghos, Alba María¹

Introducción

Al investigar debemos garantizar la protección de los derechos de los participantes y velar por la validez científica y la justificación ética y social de los proyectos de investigación.

Un requisito ético en investigación es reducir al mínimo la posibilidad de explotación de los investigados, deben ser tratados con respeto al contribuir al bien social. Algunos han denominado “brecha 10/90” porque sólo 10% del financiamiento de la investigación en el mundo se invierte en problemas de salud que afectan al 90% de la población del planeta, es decir el 90% de los esfuerzos y recursos destinados a la investigación biomédica se destinan a problemas que afectan sólo el 10% de las prioridades en salud pública a nivel global (Pinto Bustamante *et al.*, 2014). Ante este comportamiento de la investigación hay diversas alternativas que se han propuesto para corregir esta

¹ Especialista consultor en Obstetricia y Ginecología. Profesora Adjunta en la Cátedra de Obstetricia de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora Adjunta en la Cátedra de Ética y Marco legal de la Tecnicatura de Prácticas Cardiológicas. Presidente del Comité Bioética y Ética en la Investigación (COBIMED). Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

desigualdad, así tenemos que priorizar las líneas de investigación, tener acceso a medicamentos esenciales en términos de equidad y la estrategia de investigación basada en la comunidad.

El objetivo principal de la Investigación clínica es generar conocimiento para mejorar la salud y el bienestar y/o aumentar la comprensión de la biología humana. Los sujetos participantes son un medio para asegurar tal conocimiento. Asimismo, hay un potencial de explotación que pone a sujetos en riesgo de ser perjudicados por el bien de otros.

Cuando hablamos de Normas de Buenas Prácticas Clínicas (Good Clinical Practice GCP) (Ezaquiel, 1999) hablamos de Estándares éticos internacionales de calidad científica para diseñar, conducir, registrar y reportar estudios que involucran la participación de humanos. Cumplirlas, garantiza la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los sujetos de 1 estudio, con los principios de la Declaración de Helsinki. En respuesta a muchos sucesos específicos en los cuales no fue ético investigar, hay documentos escritos:

- a. **Informe Belmont, (abril 1974)** proporciona marco filosófico a reglas y reglamentos desarrollados por escándalos en las investigaciones en E.U: Tuskegee y Willowbrook.
- b. **Normas CIOMS, (1993)**, concebidas para aplicar la Declaración de Helsinki en países en vías de desarrollo, en particular, para ensayos a gran escala de vacunas y medicamentos, especialmente SIDA.
- c. **Código de Nuremberg (1996)**, formó parte de la decisión jurídica que condenó atrocidades de médicos nazis.
- d. **Declaración de Helsinki, (1997)** desarrollada para remediar lagunas del Código de Nuremberg, relacionadas con médicos que realizaban investigaciones en pacientes. Todo investigador debe saber que **está prohibido investigar**: Si hay método alternativo de eficacia comparable. Si hay riesgo desproporcionado/

beneficio potencial. Sin autorización de autoridad competente. Sin evaluación independiente científica y ética. Sin información sobre derechos y garantías. Sin Consentimiento Informado (CI) libre, explícito, escrito y revocable. Sin garantizar derechos de los que participan. Sin justificación ética y social de los proyectos.

Principios éticos en la Investigación con humanos

1. **Respeto hacia las personas:** El investigado debe ser tratado como ser autónomo.
2. **No Maleficencia:** “*Primum non nocere*”: no realizar acciones que puedan causar daño. Si no se puede hacer el bien, por lo menos no hacer daño.
3. **Beneficencia:** No dañar, maximizar beneficios y minimizar daños posibles.
4. **Justicia:** especial la distributiva. Distribución equitativa de **riesgos/ beneficios**.
5. **Obligación de Seguridad.**
6. **Obligación de Información (Consentimiento Informado).**
7. **Deberes de Confidencialidad.**
8. **Minimización de los riesgos.**
9. **Maximización y distribución de los beneficios.**

Las diferencias entre riesgos y beneficios se justifican si se basan en distinciones moralmente relevantes entre las personas, por ejemplo: **la vulnerabilidad. Siempre se debe proteger los derechos y bienestar de las personas vulnerables.**

La investigación debe dejar a los países de bajos recursos mejor y no peor de lo que estaban. El producto que se desarrolle debe quedar a su alcance. Las personas deben ser lo menos vulnerables posible en la investigación. El riesgo a los vulnerables es más justificado si hay procedimientos que ofrecen esperanza de beneficio relacionado con su salud. En investigación hay **7 Requisitos Éticos para saber si una investigación es ética** (Organización Panamericana de la Salud, 2005). Estos

fueron expuestos por Ezequiel Emanuel y son universales: **1) Valor;** **2) Validez;** **3) Selección equitativa, Favorable;** **4) Relación riesgo/beneficio;** **5) Evaluación independiente;** **6) Consentimiento informado;** y **7) Respeto por los participantes.**

- 1) **Valor:** Una investigación, para que sea ética, debe tener valor social, científico, clínico y conducir a mejorar la salud y el bienestar de la población. La investigación no debe consumir los recursos limitados innecesariamente, sin producir resultados valiosos y no exponer a los seres humanos a riesgos potenciales a menos que se espere un resultado valioso.
- 2) **Validez científica:** La Investigación mal diseñada metodológicamente invalida los resultados, debe ser con posibilidad de ser reproducida, debe tener objetivo científico claro y poder llevarse a cabo. Debe tener principios, métodos y prácticas seguras y aceptadas, que evite la explotación del sujeto de investigación. Sin validez, el estudio no genera conocimiento, no produce beneficio o no justifica riesgo o daño a las personas ni la inadecuada utilización de los recursos.
- 3) **Selección equitativa del sujeto:** La selección de los sujetos debe estar relacionada con los interrogantes científicos (se reclutan los que estén en condiciones de beneficiarse si la investigación proporciona un resultado positivo, como ser un nuevo tratamiento) y debe ser equitativa, ofreciendo a todos oportunidad de participar, solo si hay razón científica o riesgo que lo restringe y debe ser una selección basada en los objetivos y no en las desigualdades sociales. La selección de sujetos debe estar diseñada para reducir al mínimo los riesgos para los sujetos a la vez que se maximizan los beneficios sociales y científicos de los resultados de la investigación.
- 4) **Proporción favorable de Riesgo-Beneficio:** La investigación en sujetos humanos puede implicar considerables riesgos y beneficios. Los riesgos potenciales a los sujetos individuales se minimizan. Los beneficios potenciales a los sujetos individuales o a

la sociedad se maximizan. Los beneficios potenciales deben ser proporcionales o exceder a los riesgos asumidos. Proporción favorable de riesgo-beneficio.

- 5) **Evaluación independiente:** Por peritos no participes con autoridad para aprobar, enmendar o cancelar el estudio. Realizada en Comités de Ética de cada centro, son miembros con formación en investigación y elevada calificación científica, para evaluar aspectos éticos y bases científicas del diseño del estudio. Algunos estudios deben tener representación de la comunidad con criterios sobre valores morales y culturales a respetar.
- 6) **Respeto a los sujetos inscriptos:** Se debe permitir al sujeto cambiar de opinión; retirarse sin sanción, respetar su privacidad con reglas de confidencialidad; informar datos nuevos, riesgos/beneficios del estudio. Se debe informar a los sujetos resultados de la investigación. Asimismo, se debe vigilar al sujeto, en caso de posibles eventos adversos; y tratarlos, si es necesario retirarlo.
- 7) **Consentimiento Informado:** El individuo participará en el estudio sólo si es compatible con sus valores, creencias, intereses y preferencias. Se debe respetar su autonomía. Se debe informar riesgos que puedan ocurrir y estar bien informado. Poner en práctica estos requisitos éticos y determinar si un ensayo de investigación cumple con cada uno de ellos implica habilidades, capacitación y aptitudes que deben tener los investigadores evaluadores. El quinto punto del Código de Nuremberg declara que “ningún experimento debe conducirse donde exista una razón a priori de creer que ocurrirá la muerte o una lesión incapacitadora”. En enfermedades letales, como SIDA y cáncer, algunos riesgos limitados de muerte debido a la investigación pueden ser éticamente aceptables.

Los elementos del Consentimiento Informado son:

1. **Descripción:** propósito del proyecto. Explicar si es experimental, cuál es propósito y la duración de la participación.

2. **Riesgos:** describir los previsible, las posibles reacciones alérgicas.
3. **Beneficios:** los posibles para él u otros.
4. **Confidencialidad:** la información que se debe dar al sujeto de investigación es un resumen escrito, de información mínima. Se debe redactar en 2da persona del singular “Usted ha sido invitado/a a participar en el estudio”. Se deben adjuntar los datos del Investigador, el tipo de Investigación, la fuente de financiamiento, el lugar a desarrollarse (Institución, Universidad, etc.), el propósito, los objetivos y preguntas del estudio, así como criterios de inclusión y exclusión. Asimismo se debe indicar el número de voluntarios y las razones por las que se invita a participar. Se deben informar las actividades que realizará, los tiempos y los instrumentos que se utilizaran, así como los posibles beneficios y/o riesgos. En el formulario para la firma deben encontrarse el documento que la persona/representante legal y el testigo firman para dejar constancia de que recibieron información suficiente acerca del Ensayo o Proyecto, de sus derechos como sujeto de investigación y su deseo libre y voluntario de participar, pudiendo revocarlo en cualquier momento.

Ética en las publicaciones (Vera Carrasco, 2011)

Hablaremos del manejo de la información, de la confidencialidad de las conductas inadecuadas en publicaciones de los Estudios de Investigación.

En cuanto al Diseño del estudio, no es ético:

- No seguir normas éticas de experimentación.
- No tener Consentimiento Informado.
- No ser Aprobado por Comité autorizado.
- No respetar la confidencialidad.
- No realizar una adecuada inclusión/exclusión de participantes en el Estudio.

En cuanto al contenido del artículo, no es ético:

Inventar: ya sea parte o la totalidad de los datos.

Plagiar: apropiarse de ideas, frases, resultados, imágenes, artículos, trabajos, libros; presentarlos como propios, sin citar su fuente original.

Manipular datos: adecuarlos a hipótesis de trabajo o descartar resultados que no concuerdan.

En cuanto al Autor: si contribuyó al diseño, analizó, recopiló, preparó, corrigió el texto, elaboró bases de datos bibliográficos, interpretó resultados, revisó final del artículo, es ético que se coloque como autor, pero a veces se realiza “Autoría regalada”

por favor, halagar al jefe se informa como autor. Ser autor es ser responsable del contenido y es una conducta antiética omitir el nombre de algún autor. No es autor quién ayudó poco, dio ayuda de laboratorio, 1 bibliografía o realizó la estadística, debería incluirse en agradecimientos (Miyahira Arakaki, 2000).

Faltas en el proceso de publicación:

Realizar una segunda publicación y no decir dónde se publicó o no tener autorización; agregar modificaciones, fragmentar información, publicar como “diferente” para aumentar el número de publicaciones. Tampoco es válida la “Publicación inflada”, es decir, añadir casos clínicos no reales.

Incorrecciones bibliográficas:

Omitir citas voluntariamente. Copiar lista de citas sin consultarlas.

Sesgos de Publicación:

Publicar sólo datos (+) y omitir los (-), o adaptarlos a objetivos propuestos.

Publicidad de resultados de 1 investigación:

Dar a conocer resultados antes de publicar en Revista científica; crear falsas expectativas de un tratamiento.

Fraude científico

Es el más grave de todos. Estafa a la comunidad científica, contradice esencia de la ciencia: la objetividad empírica.

Hay 2 formas de fraude: **Fabricar** parte o total de datos de 1 estudio; e **inventar, falsificar o manipular** datos, métodos o valores para demostrar su hipótesis.

Hay Instituciones consultivas contra el fraude científico como el Comité de Integridad Científica creado en E.E.U.U (1990) y el Comité de Ética para las C. del Centre Nacional, Francia (1994). Existen instituciones similares en Australia, Dinamarca, Finlandia, Noruega. Tenemos como ejemplo un famoso fraude científico de células madres. El “Hwang Woo Suk. Fraude con células madres (5/ 2005)” salió en la Revista *Science*, realizado por Hwang Woo Suk, científico coreano. Este aseguró haber logrado la clonación de embriones humanos y la extracción de sus células madres. La Universidad de Hwang no encontró evidencia, por lo que el trabajo se consideró falso. No solo dañó su reputación (por lo que pidió disculpas avergonzado), sino además el prestigio de la revista científica en cuestión. Fue condenado a 2 años de cárcel y se le acusó de malversación de fondos estatales y violación de leyes bioéticas. Otro caso famoso fue el de los ratones pintados de William T. Summerlin en 1970. William T. Summerlin, célebre por realizar trasplantes de órganos en la Universidad de Stanford, trasplantó piel de una persona de piel blanca a una de color sin mostrar rechazo. Summerlin, en 1974, en el Instituto Sloan Kettering, injertó piel de dos ratones negros en dos albinos. Evitando el rechazo, cultivó piel en un plato de nutrientes semejantes antes del trasplante. Al mostrar resultados, vio que la piel injertada se blanqueaba, no iba bien. Summerlin entonces oscureció la piel, pintándola. Su carrera y reputación se destruyeron. Pasó a la historia como “el caso de los

ratores pintados”. Otro escándalo fue el de la vacuna que provocaba autismo. Durante 1998, en Londres, el Dr. Andrew Wakefield publicó en *The Lancet* un estudio en donde relacionó al autismo con la vacuna tripe viral (rubeola, sarampión, parotiditis). Esto produjo que disminuyera el número de niños vacunados, fue un evidente peligro. A. Wakefield había recibido una suma sustanciosa de dinero de una Asociación de niños con autismo para usar como prueba en el juicio contra la compañía de dicha vacuna. Disminuyó la vacunación en Estados Unidos, Reino Unido e Irlanda y aumentaron los casos de paperas y sarampión. Esto hizo que hoy exista desconfianza a vacunar y provoca reaparición de enfermedades que se creían controladas. Por otro lado, un artículo en el JAMA titulado “No se crea todo lo que lee” (CNN, 2002) reportó que de 359 estudios (1989 -1998) en JAMA, NEJM, The Lancet, BMJ; 26 presentaba disminución en el Riesgo Relativo en un tratamiento y no la disminución en el riesgo absoluto. Ej.: 3,7% tratados con X droga sufren infarto y 5,1% de los tratados con placebo. Si decimos la disminución del riesgo absoluto en este caso es de 1,4% y la disminución del riesgo relativo es 27%, es posible ver que es mucho más impactante el riesgo relativo. Otro caso emblemático fue el del fabricante de **Celebrex**, que silenció los datos que no le convenían. Escrito en el diario “*El País*” de Madrid el 17 de junio de 2002. Informaba que el Celebrex (publicado en la revista JAMA en el año 2000) tenía menos riesgo de complicaciones gastrointestinales que otros antiinflamatorios. El *British Medical Journal* denunció que lo publicado era solo parte de los resultados que sí eran completos, las ventajas no eran ciertas ya que después de 6 meses del trabajo se vio que el celecoxib presentaba complicaciones de úlcera. El trabajo duró un año, pero se publicaron los resultados publicados solo de 6 meses. El *British M. Journal* publica resultados reales que contradicen lo publicado que ya estaban disponibles cuando el texto había sido enviado al JAMA.

No es fácil combatir el fraude, para ello se debería:

- Realizar formación y prevención con cursos y talleres de ética en investigación.
- Controlar publicaciones por organismos consultores independientes especializados. Podría aplicarse medidas de sanción.
- Comunicar nuevos métodos diagnósticos o terapéuticos solo después de comprobar su utilidad y eficacia.
- No publicar en medios masivos, hacerlo antes en Revistas Científicas o someter a juicio de pares (regla de Ingelfinger).

Algunos casos para pensar y discutir

1. Nace bebé con defectos congénitos múltiples: lesión de médula espinal, hidrocefalia con retardo mental, ceguera y mala audición.

Por ello se propone operar para cerrar el mielomeningocele (puede contraer infección severa y matarlo). La madre quiere que se haga la cirugía de inmediato y el padre se opone ya que siente que sería incorrecto prolongar la vida del bebé en esas circunstancias.

Discutir: ¿Qué debe hacer el equipo médico? ¿debe operarlo? ¿necesita el consentimiento de los dos padres o con el permiso de uno de ellos es válido? ¿se debe solicitar la intervención judicial o solo basta el de un Comité? ¿si fuera Ud. Participante del Comité que recomendaría? Justifíquelo.

2. Un hombre de 38 años, albañil, ingresó al hospital tras 3 semanas de tener una infección respiratoria. Diagnóstico: neumonía, ingresa a UTI. Es tratado con ATB, asistencia respiratoria. A las 3 semanas se complicó con lesión multiorgánica sistémica. Su esposa, informada del pronóstico fatal y con el paciente inconsciente, preguntó si podría obtener semen de él para poder tener un hijo. Estaban casados desde hacía 14 años y no habían podido tener hijos. Después de mucha resistencia, él había aceptado unos meses antes ver a un especialista en infertilidad. Después de varias pruebas consintieron en iniciar un primer ciclo de fertilización *in vitro* aquel mismo mes, aunque no fue posible con-

tinuar con el tratamiento debido a la neumonía de él. Justificaba su pedido al decir que su esposo hubiera deseado mucho tener un hijo, y como hijo único quería continuar el apellido de su flia. La hermana del marido, que acompañaba a su cuñada, lo rectificó.

A. ¿Debe ser atendida la solicitud de la esposa del paciente?

- 1) No, porque su esposo no otorgó su CI para realizar este procedimiento.
- 2) Si, porque su esposo otorgó previamente un consentimiento implícito para realizar este procedimiento por su deseo de una fertilización *in vitro*.
- 3) Si, pero sólo con orden judicial fundamentada en el mejor interés del niño por nacer, la intención de la esposa y su fin respecto a la maternidad que se persigue.
- 4) ¿Pensaría igual si fueran embriones congelados que la viuda desea implantar?

Referencias bibliográficas

- Pinto Bustamante, B.J.; Mojica, M.C.; Endo Pascuas, J.H.; Idárraga, J. (2014). Bioética y la brecha 10/90 Bioética y la brecha 10/90: fallos, desafíos y oportunidades. *Revista Redbioética/UNESCO*, Año 5, 2: 81-93, julio - diciembre 2014 ISSN 2077-9445.
- Ezaquiel, E. (1999). ¿Qué hace que la investigación clínica sea ética? Siete requisitos éticos. En: Pellegrini, A. y Macklin, R. (eds). *Investigación en Sujetos Humanos: Experiencia Internacional*. Santiago de Chile: Programa Regional de Bioética OPS/OMS, 1999: 33-46.
- Organización Panamericana de la Salud. (2005). Buenas prácticas clínicas: Documento de las Américas. *IV Conferencia Panamericana para la Armonización de la Reglamentación farmacéutica*. República Dominicana, 2-4 de marzo de 2005.

- Vera Carrasco, O. (2011). Ética de las publicaciones científicas en las revistas médicas. *Revista Médica La Paz*, v. 17, La Paz.
- Miyahira Arakaki, J. (2000). Problemas éticos en la autoría y en la divulgación de los resultados de la investigación biomédica. *Rev Medica Hered*, vol. 11, no. 1. Lima.
- CNN. (4 de junio de 2002). Jama: no se crea todo lo que lee. Traducido y editado por Núria Homedes.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS LÍPIDOS NUCLEARES¹

*Ves Losada, Ana²
Layerenza, Juan Pablo³*

Introducción

El núcleo es una de las características distintivas que define a las células eucariotas.

El núcleo es el principal reservorio genético de la célula eucariota, en su interior se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción entre otros.

El núcleo, el organoide más grande de las células eucariotas, está delimitado por la envoltura nuclear (EN), la cual se compone de una red de filamentos intermedios (lámina nuclear), y dos membranas, la membrana nuclear interna (MNI) y la externa (MNE), respectivamente. La MNI interacciona con la lámina a través de proteínas de unión (por ejemplo la LAP2) y la MNE presenta continuidad con

1 Los resultados que se presentan corresponden a secciones específicas de las publicaciones Layerenza JP y col BBA (2013) 1831: 327-340; y Lagrutta LC y col PLoS ONE (2017) 12(1): e0170608.

2 Licenciada en Ciencias Bioquímicas (orientación bioquímica clínica) y Dra. en Ciencias Bioquímicas (orientación bioquímica clínica) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Profesora de Biología en la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Investigadora del CONICET.

3 Licenciado en Bioquímicas y Dr. de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Jefe de Trabajos Prácticos de Ciencias Exactas en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Profesional Adjunto del CONICET.

el retículo endoplásmico (RE) rugoso; el espacio entre ambas membranas presenta continuidad con el lumen del RE (Hetzer, 2010).

La primera demostración de la existencia de lípidos (Chayen, Gahan y Cour, 1959) y los primeros reportes sobre lípidos neutros (LN) en el núcleo se remontan hacia fines de los '60 y principios de los '70; dichas investigaciones se realizaron junto con el desarrollo de los primeros protocolos para el aislamiento de núcleos. En esos años, investigaciones independientes de Kashnig (1969), Kleining (1970), Keenan (1970) y Khandwala (1971) en núcleos y membranas nucleares aislados de hígado de rata, cerdo y vaca, demostraron que en el núcleo había lípidos polares (LP) y neutros (LN: colesterol (C), ésteres de colesterol (CE) y triacilglicéridos (TAG). Posteriormente surgieron evidencias indirectas de la existencia de LN en el núcleo cuando se realizaron estudios de incorporación de ácidos grasos (AG) exógenos radiactivos (1988) *in vitro* y se encontró marcación radiactiva en LP y TAG. En los años siguientes las investigaciones se centraron en los LP y en el C nuclear.

Objetivos generales

El objetivo general en los que se enmarcan estos resultados es determinar la función de los lípidos nucleares.

La información generada permitirá un mejor diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de patologías donde la homeostasis lipídica esté alterada. Permitirá establecer si los lípidos nucleares se relacionan y/o regulan como los citosólicos en condiciones normales y patológicas, e incorporarlos como blancos alternativos para los tratamientos de obesidad, diabetes, dislipemias, aterosclerosis y procesos neurodegenerativos.

Objetivos específicos e hipótesis de trabajo

Determinar la composición, topología y propiedades fisicoquímicas de los lípidos del núcleo.

Proponer un modelo de organización espacial de los lípidos nucleares.

Hipótesis

En el núcleo los LP y el C se encuentran mayoritariamente en la EN, mientras que en el interior nuclear se concentran los LN (C, CE y TAG).

Los LN nucleares se organizan en gotas lipídicas nucleares (nLD) similares a las citosólicas, formadas por un core hidrofóbico y rodeados por una monocapa lipoproteica.

Materiales y Métodos

Toda la información respectiva se encuentra especificada y publicada en los respectivos trabajos (Layerenza *et al.*, 2013; Gaenor Jacobsen, 2019).

Resultados

Composición lipídica y contenido proteico de núcleos y matrices nucleares de células hepáticas

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la organización de los lípidos nucleares.

Como modelos experimentales, se trabajó con núcleos enteros y matrices nucleares (Mx) aislados de hígado de rata, mediante protocolos de fraccionamiento celular que se diseñaron en el laboratorio (Ves Losada y Brenner, 1995; Mate, Brenner y Ves Losada, 2006). Los lípidos nucleares que no se localizan en la doble membrana nuclear, que los denominamos lípidos endonucleares, se analizaron en las Matrices nucleares, que se obtuvieron eliminando las membranas con el detergente no iónico Tritón X-100 0.08 % (Layerenza *et al.*, 2013).

Por lo cual, el primer paso fue obtener la composición lipídica nuclear. Como se muestra en las Figuras 1 y 2, determinamos la compo-

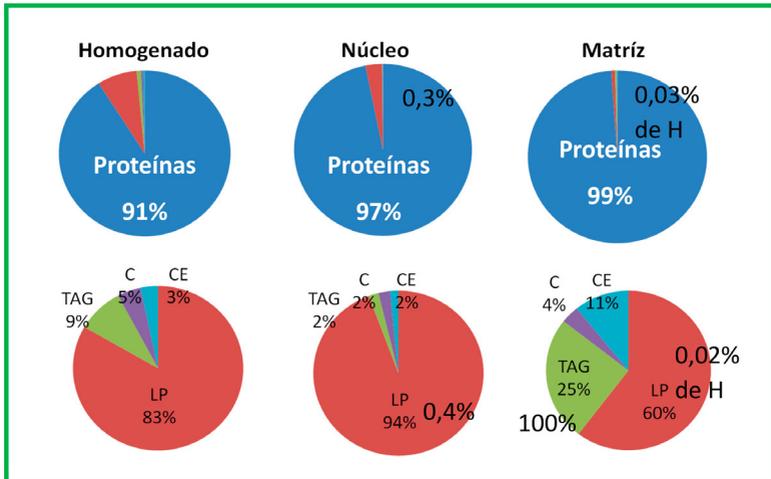
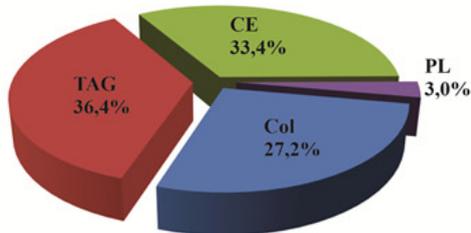


Figura 1. Composición lipídica y contenido proteico del homogenado Núcleo y Matriz nuclear de hígado de rata.

Las muestras fueron obtenidas a partir de hígado de rata. TAG: triacilgéridos; C: colesterol; CE: ester de colesterol;

LP: lípidos polares y H: Homogenado de hígado de rata. Resultados publicados en Layerenza y col. BBA 2013.

Composición química de las nLD aisladas a partir de núcleo



Las nLD poseen, aproximadamente, partes iguales de Triglicéridos (TAG), Colesterol (Cho) y Ésteres de colesterol (CE), y un pequeño porcentaje de Fosfolípidos (PL).

Figura 2. Composición de las clases lipídicas de las nLD de hígado de rata. Las muestras fueron obtenidas a partir de hígado de rata. nLD: Gotas lipídicas nucleares, TAG: triacilgéridos; C: colesterol; CE: ester de colesterol; LP: lípidos polares, GPL: glicerofosfolípidos, SL: esfingolípidos. La figura fue adaptada del trabajo de Tesis doctoral del Dr. JP Layerenza (UNLP, 2013).

sición lipídica y el contenido proteico del homogenado, de los núcleos y de las matrices nucleares aisladas de hígado de rata.

Observando los datos de recuperación respecto del homogenado vemos que los lípidos y las proteínas nucleares representan una pequeña proporción del total celular con valores de 0,3 y 1 %, respectivamente (*Ibíd.*, 2013). Aún dentro de los componentes nucleares, los lípidos siguen conformando un grupo minoritario (3%) mientras que las proteínas en proporción dan cuenta del 97% restante. Cabe destacar que los ácidos nucleicos no fueron tenidos en cuenta para el cálculo.

Los lípidos nucleares están compuestos principalmente por lípidos polares (94%), los LN corresponden al 6% restante. Los PL nucleares tanto del núcleo entero como los de la matriz han sido caracterizados por tener tanto glicerofosfolípidos (GPL) como esfingofosfolípidos (SL) (Layerenza *et al.*, 2013). Los LN nucleares están compuestos por TAG, C y CE en las siguientes proporciones 22, 53 y 25%, respectivamente, Figura 1-2.

Los lípidos de la matriz nuclear, considerados como endonucleares (ya que la matriz se obtuvo eliminando la doble membrana nuclear con Tritón X-100), representan el 0,03% de los lípidos totales presentes en el homogenado de hígado. Los lípidos conforman el 1% de los componentes. En la matriz nuclear se localizan sólo el 6% de los lípidos nucleares ya que el resto corresponde a los componentes de la membrana nuclear. Los lípidos endonucleares están compuestos en un 60% por lípidos polares y un 40% por LN. Estos últimos están compuestos por TAG, C y CE en la siguiente proporción: 54, 17 y 29%, respectivamente (*Ibíd.*, 2013).

Es interesante observar que una gran proporción del CE (60%) y una baja del C (16%) son recuperadas en la matriz nuclear respecto del núcleo, esto se debe a que el C es un componente importante de la membrana nuclear que es removido durante la obtención de las matrices; mientras que el CE es altamente hidrofóbico y es excluido de las membranas con lo cual se aloja en dominios resistentes al Tritón X-100 dentro del núcleo.

Siguiendo el mismo razonamiento, para los TAG es lógico esperar un comportamiento análogo al CE y de hecho se recupera la totalidad en la matriz (117%). Hay que notar lo cuantitativamente pequeño que es el *pool* nuclear de TAG, representando tan sólo el 0,07% de los TAG totales del homogenado de hígado.

En conclusión, los lípidos nucleares se localizan en dos pools principales, la doble membrana nuclear compuesta de glicerofosfolípidos, esfingofosfolípidos y colesterol; y dentro del núcleo, los lípidos endonucleares están enriquecidos en TAG y CE.

Composición y localización de los ácidos grasos nucleares

En la Figura 3 se representa la proporción de AG esterificada en cada clase de lípidos nucleares y endonucleares. Estos datos se calcularon a partir de la composición lipídica del núcleo y de la matriz nuclear (Layerenza *et al.*, 2013) y considerando que los GPL, SL, TAG y CE poseen 2, 1, 3 y 1 AG esterificado, respectivamente.

En el núcleo el principal pool de AG lo constituyen los LP, y en particular los GPL: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI) en orden decreciente, que son los principales componentes de la EN (compuesta por LP y C) y como ya se presentara en la Figura 1; representan el 96 % de los lípidos nucleares; y en menor proporción fosfatidilserina (PS) y esfingomielina (SM) y los LN: TAG y C.

En el interior nuclear los principales pools de AG están constituidos mayoritariamente por TAG y PC y en mucha menor proporción por el resto de los LP (PE, PI, PS y SM) y los CE.

En el núcleo los lípidos se encuentran en dos pools contrastantes, la EN constituida mayoritariamente por LP y C y PUFA, y en la matriz nuclear por LN (TAG y CE) enriquecidos en AG saturados y AG monoenoicos (MUFA). Como se observa en la Tabla 1, los principales AG esterificados en LP son 20:4n-6 (ácido araquidónico) y 18:0 (ácido esteárico); por otro lado, entre los LN (TAG y CE) los principales AG son 16:0 (ácido palmítico), 16:1n-7 (ácido palmitoleico), 18:2n-6 (áci-

do linoleico) y 18:1n-9 (ácido oleico). En este último grupo podemos encontrar características distintivas entre los TAG y los CE, ya que los TAG poseen mayor proporción de 18:1n-9 y los CE de 16:1n-7 y 18:2n-6.

En conclusión, los LP nucleares se caracterizan por contener mayoritariamente 20:4n-6 y 18:0 y éstos se localizan en la DMN, mientras que los LN poseen mayor proporción de 16:0, 16:1n-7, 18:2n-6 y 18:1n-9 y se localizan en el interior nuclear.

Topología y composición de las poblaciones de gotas lipídicas celulares

Para evaluar la hipótesis de trabajo que sostiene que los LN nucleares se organizan en gotas lipídicas (nLD), la primera estrategia fue intentar visualizar las gotas lipídicas en núcleos a partir de células en cultivo primario de hepatocitos de rata en condiciones control. Como se observa en la Figura 4A, mediante microscopía de epifluorescencia, se observan dos poblaciones de gotas lipídicas, una en el citoplasma (cLD) y otra más pequeña dentro del núcleo (nLD) (Layerenza *et al.*, 2013).

Posteriormente se aislaron las nLD y se determinó su composición como se presenta en la Figura 2. Las nLD se componen de un 38% de lípidos y un 62% de proteínas; los lípidos y proteínas de éstas representan tan solo el 0,002% de los respectivos componentes celulares. Los lípidos de las nLD están formados en un 85% por lípidos neutros y un 15% por lípidos polares. Las nLD poseen una composición particular de lípidos neutros rica en CE (45%), C (32%) y TAG (23%) (Figura 2). Esta composición es muy diferente de la observada en homogenato total de hígado, núcleo entero, matriz nuclear y cLD.

Se propone un modelo estructural de las nLD comparable a las cLD, en el que las gotas lipídicas están constituidas por un core hidrofóbico de lípidos neutros (TAG, CE y C) rodeados de una monocapa de LP, C y proteínas, como se muestra en la Figura 4B.

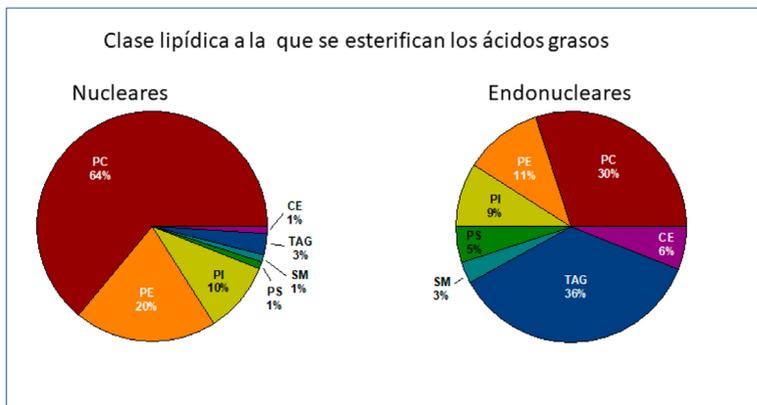


Figura 3. Pooles nucleares y endonucleares de ácidos grasos. Teniendo en cuenta la composición lipídica del núcleo y de la matriz nuclear, se calculó la proporción relativa de ácidos grasos en cada clase lipídica. Para hacer el cálculo se consideró que los LP, SM, TAG y CE poseen 2, 1, 3 y 1 ácido graso, respectivamente. La figura fue adaptada del trabajo de Tesis doctoral del Dr. JP Layerenza (UNLP, 2013).

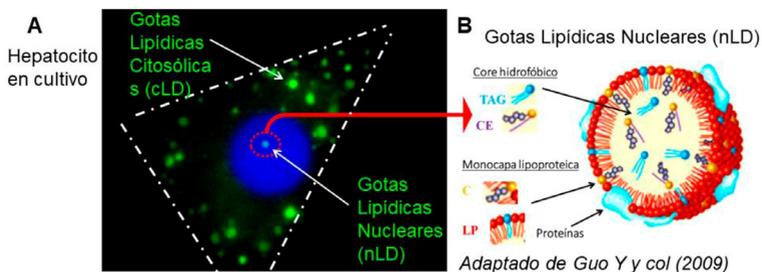


Figura 4. Topología y modelo estructural de las poblaciones de Gotas lipídicas celulares

A: Análisis mediante microscopía de epifluorescencia de cLD y nLD en cultivo primario de hepatocitos de rata en condiciones control. En azul se observa la tinción de los núcleos con DAPI y en verde, de las LD con BODIPY 493/503. Las flechas indican las cLD y las amarillas nLD. La figura fue adaptada del trabajo de Tesis doctoral de la Dra. LC Lagrutta (UNLP, 2015).

B: Modelo estructural propuesto para las nLD adaptado del de las cLD, presentado por Guo y col, 2009.

Se determinó además, que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, y coordinado con las cLD, cuyas características morfológicas se modifican en forma reversible por el ácido oleico, mediante mecanismos que involucran síntesis y degradación de los lípidos que las constituyen, y fusión y fisión de LD (Lagrutta *et al.*, 2017).

Discusión

Los lípidos en el núcleo, al igual que en el resto de la célula, son moléculas muy versátiles que poseen un activo metabolismo e importantes funciones biológicas que abarcan roles estructurales, energéticos, y en la regulación celular, en procesos de señalización actuando como segundos mensajeros.

Los lípidos nucleares se encuentran en dos localizaciones muy contrastantes, la envoltura nuclear, más fluida que el interior nuclear y compuesta de GPL, SL y C; y dentro del núcleo, en las nLD, donde se encuentran concentrados todos los TAG y CE nucleares, organizados en un core hidrofóbico rodeado de una monocapa de LP, C y proteínas asociadas. Existe además, un remanente de LP en la matriz nuclear formando complejos con la cromatina (Albi *et al.*, 1994). Los LP nucleares participan activamente como segundos mensajeros en diferentes vías de señalización que involucraran a GPL y SL (14, 15). Los LP nucleares se caracterizan por contener mayoritariamente 20:4n-6 y 18:0 en sus especies moleculares, mientras que los LN poseen en su mayoría 16:0, 16:1n-7, 18:2n-6 y 18:1n-9 esterificados en sus moléculas (Layerenza *et al.*, 2013; Mate, Brenner y Ves Losada, 2004).

En este trabajo se determinó que las nLD constituyen un dominio nuclear dinámico, que responde a estímulos celulares externos en forma reversible y coordinada con las cLD (Lagrutta *et al.*, 2017).

El metabolismo lipídico nuclear de LN está coordinado con el citosólico. Los LN celulares se localizan mayoritariamente en el citoplasma, en las cLD. Está documentado que las cLD participan en numerosos procesos celulares a través de interacciones con el RE y el Golgi (rutas anabólicas), con mitocondrias y peroxisomas (rutas ca-

tabólicas), con endosomas tempranos, caveolas y autofagosomas (vías endocíticas), VLDL y exosomas (vías exocíticas), parásitos y virus, y finalmente con el citoesqueleto, a través de microtúbulos y de proteínas motoras (Sahini y Borlak, 2014).

Los LN nucleares que se localizan y organizan en las nLD corresponden a una proporción muy pequeña de los LN celulares, pero están estratégicamente localizados dentro del núcleo habilitando un dominio hidrofóbico con características muy diferentes a las de las membranas nucleares y los demás dominios nucleares.

Las nLD estarían involucradas en la homeostasis lipídica, y en el interior nuclear servirían como un sistema *buffer* capaz de aportar o incorporar en forma rápida proteínas y lípidos involucrados en vías de señalización, aportando ligandos (AG, DAG, etc.) para factores de transcripción, sustratos, y enzimas del metabolismo lipídico y de otros procesos que se desarrollan dentro del núcleo.

Los procesos nucleares de señalización deben encenderse y apagarse, y las nLD podría actuar proveyendo AG, liberados a partir de la hidrólisis de sus lípidos, que movilizados unidos a la FABP (Mate, Layerenza y Ves Losada, 2007), se unirían a factores de transcripción como los PPARs, y luego, finalizado el “encendido” el proceso se apagaría cuando los AG, liberados de los factores de transcripción, se esterifiquen en los lípidos de las nLD y/o de la membrana nuclear.

Referencias bibliográficas

- Albi, E.; Mersel, M.; Leray, C.; Tomassoni, M.L.; Viola-Magni, M.P. (1994). Rat liver chromatin phospholipids. *Lipids*. 1994; 29(10):715-9.
- Chayen, J.; Gahan, P.; Cour, L. (1959). The Masked Lipids of Nuclei. *Quart J Microscop Sci*. 1959;100.
- Fukuda, H.; Tatsumi, H.; Iritani, N.; Katsurada, A.; Kinoshita, C.; Fujita, H.; Tanaka, T. (1988). Lipogenic enzyme induction and incorporation of exogenous fatty acid into liver and liver nuclei. *Biochim Biophys Acta*. 1988;960(1):19-25.
- Gaenor Jacobsen, R.; Mazloumi Gavgani, F.; Edson, A.; Goris, M.; Altankhuyag, A.; Lewis, A. (2019). Polyphosphoinositides in the nucleus: Roadmap of their effectors and mechanisms of interaction. *Adv Biol Regul*.
- Gaveglio, V.L.; Pasquar, S.J.; Giusto, N.M. (2011). Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;507(2):271-80.
- Hetzer, M.W. (2010). The nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.; 2(3): a000539.
- Kashnig, D.M.; Kasper, C.B. (1969). Isolation, morphology, and composition of the nuclear membrane from rat liver. *J Biol Chem*. 1969; 244(14): 3786-92.
- Keenan, T.W.; Berezney, R.; Funk, L.K.; Crane, F.L. (1970). Lipid composition of nuclear membranes isolated from bovine liver. *Biochim Biophys Acta*. 1970;203(3):547-54.
- Khandwala, A.S.; Kasper, C.B. (1971). The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei. *J Biol Chem*. 1971;246(20):6242-6.
- Kleinig, H. (1970). Nuclear membranes from mammalian liver. II. *Lipid composition*. *J Cell Biol*. 1970;46(2):396-402.

- Lagrutta, L.C.; Montero-Villegas, S.; Layerenza, J.P.; Sisti, M.S.; García de Bravo, M.M.; Ves-Losada, A. (2017). Reversible Nuclear-Lipid-Droplet Morphology Induced by Oleic Acid: A Link to Cellular-Lipid Metabolism. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0170608.
- Layerenza, J.P.; Gonzalez, P.; Garcia de Bravo, M.M.; Polo, M.P.; Sisti, M.S.; Ves-Losada, A. (2013). Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(2):327-40.
- Ledeen, R.W.; Wu, G. (2008). Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *J Lipid Res*. 2008;49(6):1176-86.
- Mate, S.M.; Brenner, R.R.; Ves-Losada, A. (2004). Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;70(1):49-57.
- Mate, S.M.; Brenner, R.R.; Ves-Losada, A. (2006). Endonuclear lipids in liver cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(3-4):459-68.
- Mate, S.M.; Layerenza, J.P.; Ves-Losada, A. (2007). Incorporation of arachidonic and stearic acids bound to L-FABP into nuclear and endonuclear lipids from rat liver cells. *Lipids*. 2007;42(7):589-602.
- Sahini, N.; Borlak, J. (2014). Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Progress in Lipid Research*. 2014;54(0):86-112.
- Ves-Losada, A.; Brenner, R.R. (1995). Fatty acid delta 5 desaturation in rat liver cell nuclei. *Mol Cell Biochem*. 1995;142(2):163-70.

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 tesisistas que realizan su actividad científica en la Facultad de Ciencias Médicas.

Prof. Dra. María Virginia Croce. Médica, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Licenciada en Ciencias Naturales, especialidad Antropología, Facultad de Ciencias Naturales, UNLP.

Doctora en Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Investigadora Principal de la Comisión Científica de la provincia de Buenos Aires.

Secretaria de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Profesora Adjunta de la Cátedra de Citología, Histología y Embriología B de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Directora del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA) (UNLP, CIC/PBA).

Investigadora invitada de la Cancer Research Campaign, Universidad de Nottingham, Nottingham, Inglaterra y del King's College, Londres, Inglaterra.


EDITORIAL DE LA UNLP

