



# Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers

Volumen XXXI



---

**Anales**

---

**de la Fundación**

---

**Alberto J. Roemmers**

---

**Volumen XXXI**

# ÍNDICE

SUBSIDIOS 2016 - 2018

IDENTIFICACIÓN POR PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA Y VALIDACIÓN DE EPITOPES PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA

G. R. Acevedo

AISLAMIENTO DE BOCAVIRUS EN CULTIVO A PARTIR DE MUESTRAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS HOSPITALIZADOS POR NEUMONÍA

M. P. Adamo, L. M. Ghietto, A. P. Toigo D'Angelo, F. Viale, S. X. Rivadera

MODULACIÓN DEL SECRETOMA TUMORAL DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (ALL) ANTE EL ESTÍMULO DE HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

M. A. Amorós, G. A. Cremaschi, G. Klein, M. E. Padín

IMPACTO DE LAS DISTINTAS TERAPIAS ACTUALES CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA RECUPERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y EN EL DESARROLLO DE INMUNIDAD FRENTE A FUTURAS EXPOSICIONES

M. N. Badano

EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD16, CD163 Y MerTK COMO BIOMARCADORES DE LA TUBERCULOSIS

L. Balboa

PRIMER ESTUDIO GENÉTICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN UNA POBLACIÓN DE LA ARGENTINA, ZONA SURESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

V. Bañares, P. Corral, L. Schreier

DETECCIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS CON IMPACTO EN SALUD HUMANA EN FRUTAS FINAS CULTIVADAS Y/O COMERCIALIZADAS EN NEUQUÉN, ARGENTINA

P. A. Barril, J. M. Oteiza, M. V. Jaureguiberry, S. A. Soto

PATÓGENOS INTESTINALES EN LA POBLACIÓN CON DIARREA PERSISTENTE. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO PROSPECTIVO DE CONSULTAS AMBULATORIAS EN UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

J. A. Basualdo Farjat, N. B. Molina, S. Lissarrague, E. Bertucci

EMPLEO DE REGULADORES DE CALCIO INTRACELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFERTILIDAD DE PACIENTES ASTENOZOOSPÉRMICOS CON MENORES NIVELES DE LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA CRISP2

N. G. Brukman

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE PARACOCCIDIOIDES SPP. EN ARGENTINA

M. E. Cattana

ESTUDIO DE LA RESERVA MEDULAR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO. IMPORTANCIA TERAPÉUTICA

N. A. Chasseing, F. R. Borzone, G. Yannarrelli, L. M. Martínez, M. B. Giorello, V. Labovsky, L. Feldman, E. Batagelj, F. Dimase

ESTUDIO ECO-EPIDEMIOLÓGICO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS EN UN ÁREA URBANA PROTEGIDA: RESERVA ECOLÓGICA COSTANERA SUR (CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES)

G. L. Cicuttin, M. N. De Salvo



HIPERACTIVIDAD HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-ADRENAL Y  
FUNCIÓN MNÉSICA EN EL ENJEVERCIMIENTO. ESTUDIO NO  
INVASIVO

L. N. Contreras, E. M. L. Cardoso, A. L. Arregger, R. Sanchez, M. L.  
Saglio, V. Salutto

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL FLUORURO Y EL MPF EN  
DENTÍFRICOS Y SU RELACIÓN AL CONTENIDO DE OTROS  
COMPUESTOS

M. V. Cornaglia

ESTUDIO DE LA IMPORTANCIA CLÍNICA DE ErbB-2 EN EL  
CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

M. A. Cortés, R. Cordo Russo, J. R. Zimerman

GENES IMPLICADOS EN CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

M. Delea, N. Buzzalino, P. Barbero, M. P. Bidondo

EVALUACIÓN DEL PERFIL MUTACIONAL Y SU RELACIÓN  
CON LOS FACTORES PRONÓSTICO EN LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA CRÓNICA

P. Dos Santos

IMPACTO DE LAS OBRAS DE RENOVACIÓN HOSPITALARIA  
SOBRE LA BIOTA FÚNGICA AMBIENTAL, COMO FUENTE DE  
INFECCIÓN FÚNGICA NOSOCOMIAL

M. S. Fernández, G. Giusiano

RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ASOCIADA A LA  
PRESENCIA DE MUTACIONES Y EXPRESIÓN ALTERADA DE  
GENES EN LEUCEMIAS PHILADELPHIA (+)

C. A. Ferri, M. M. Formichela

PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA  
INFECCIÓN POR LOS VIRUS BK Y JC EN INDIVIDUOS  
INFECTADOS CON VIH DE CÓRDOBA

M. C. Frutos, M. Albizúa Verdinelli, M. Balangero, S. Blanco, S. Gallego

HIPOGONADISMO EN LA INFANCIA Y PUBERTAD. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN TESTICULAR DE NIÑOS Y ADOLESCENTES SOMETIDOS A TRATAMIENTOS ONCOLÓGICOS POR PATOLOGÍA PRIMARIA EXTRAGONADAL

R. P. Grinson, M. Arozarena de Gamboa, L. Aversa, S. Prada, M. E. Gutiérrez, P. Bedecarrás, R. Rey

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES EN EL GEN DEL TRANSDUCTOR DE LA SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN (STAT)-3 HALLADAS EN NIÑOS CON RETRASO DEL CRECIMIENTO. IMPLICANCIA EN LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

M. Gutiérrez, L. Ramírez, P. Scaglia, M. G. Ballerini, L. Martucci, L. Karabatas, H. Domené, H. Jasper

BÚSQUEDA DE POTENCIALES FÁRMACOS ANTITUMORALES: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS OBTENIDOS DE PLANTAS NATIVAS DE ARGENTINA

M. B. Joray

PREVALENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN HFE EN PACIENTES CON RASGO  $\beta$ -TALASÉMICO Y EN INDIVIDUOS SALUDABLES DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN. ESTUDIO ANALÍTICO DE SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DEL HIERRO

S. S. Lazarte, M. E. Mónaco, N. S. Álvarez Asensio, C. Haro, M. E. Ledesma Achem, M. M. Terán, B. A. Issé

ESTUDIOS FUNCIONALES Y EPIDEMIOLOGICO DE LOS EFECTOS DEL FLÚOR Y EL ARSÉNICO SOBRE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

M. Lupo, M. V. Neira, S. Vaquero, A. Rigalli

INCORPORACIÓN DE NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS DEL POTENCIAL ÉXITO REPRODUCTIVO DE UNA MUESTRA Y OPTIMIZACIÓN DE ABORDAJES TERAPÉUTICOS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE LA INSEMINACIÓN INTRAUTERINA EN PACIENTES INFÉRTILES  
G. M. Luque, C. Baró Graf, N. Torres, L. del C. Puga Molina, A. Romarowski, A. La Spina Florenza, D. Krapf, M. G. Buffone

DESARROLLO DE UN NUEVO MARCADOR BIOLÓGICO PARA LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO BASADO EN EL ESTUDIO DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS B  
J. P. Mackern Oberti

EPIDEMIOLOGÍA MICROBIANA EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA II P. F. Martina

INDICADORES DE CONTAMINACIÓN VIRAL DE ALIMENTOS. CÓRDOBA ARGENTINA  
G. Masachessi, S. V. Nates, J. V. Pavan, L. C. Martínez, M. B. Isa, M. O. Giordano, V. Prez

ESTUDIO DEL ROL DE LA PROTEÍNA DE ESTRÉS HSP27 Y DEL DAÑO AL ADN COMO MARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A DROGAS ANÁLOGAS DEL PLATINO EN PACIENTES ONCOLÓGICOS  
S. Nadin

EVALUACIÓN DE COMPONENTES SÉRICOS EN MIASTENIA GRAVIS COMO POTENCIALES MARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD: AUTOANTICUERPOS Y SISTEMA COMPLEMENTO  
M. L. Paz, D. González Maglio, F. Aguirre, A. M. Villa, J. Leoni

ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCIÓN OSTEOARTICULAR EN PACIENTES CON BRUCELOSIS

A. I. Pesce Viglietti, P. C. Arriola Benitez, M. V. Gentilini, G. Giambartolomei, M. V. Delpino

EXPLORANDO ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE HEPATITIS B EN CÓRDOBA, DESDE LA INTRODUCCIÓN DE LA VACUNA EN POBLACIÓN GENERAL (2012) V. Ré, G. Castro, M. B. Pisano, M. G. Barbás

ESTRONGILOIDOSIS EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS: HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO  
S. Repetto, C. D. Alba Soto, P. Ruybal, M. Risso, M. Sierra, E. Batalla, M. Bravo

VÍAS ASOCIADAS AL DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS (EDT) Y ESTUDIO DE TERAPIAS NATURALES ACORDES PARA SU TRATAMIENTO  
A. Ricci

INFECCIONES POR LEVADURAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS  
F. D. Rojas

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS REGULADORES DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE CÉLULAS TCD4 COMO MARCADORES DE RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD EN LA TUBERCULOSIS HUMANA  
A. Rolandelli, J. M. Pellegrini, N. O. Amiano, M. P. Morelli, F. A. Castello, N. L. Tateosian, A. Levi, N. Casco, D. J. Palmero, V. E. García

EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA MICROPAPILAR INVASOR, DE SU EXPRESIÓN DE MUCINA 4 Y DE SU VALOR PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO  
R. Schillaci, M. F. Mercogliano, G. Inurrigarro, M. De Martino

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL NEUROPSICOLÓGICO Y MOLECULAR DE ADOLESCENTES CONSUMIDORES DE PASTA BASE DE COCAÍNA (PBC O PACO)

S. V. Sonzogni, L. Alethia de la Fuente, S. Schurmann Vignaga, A. Ibañez, E. T. Cánepa

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HRG (HISTIDIN RICH GLYCOPROTEIN) EN LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA Y SU ASOCIACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

N. S. Sotelo

PREVALENCIA DE RIESGO DE ASMA EN ADOLESCENTES EXPUESTOS A CENIZA VOLCÁNICA, EN 2 POBLACIONES DE LA PATAGONIA

I. Zabert, S. Benitez, F. Mariluan, G. E. Zabert



**ALBERTO J. ROEMMERS**

**1890 - 1974**



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

Presidente  
**Dr. Rodolfo F. Hess**

Vicepresidente  
**Dr. Ángel Omar Scapin**

Secretario  
**Dr. Julio A. Bellomo**

Vocales  
**Sr. Eduardo Macchiavello**  
**Sr. Alberto Roemmers**  
**Sr. Alejandro Guillermo Roemmers**  
**Sr. Alfredo Pablo Roemmers**  
**Dr. Guillermo Fornari**

Fiscalizadores  
**Dr. Eduardo L. Billinghamurst**  
**Dr. Carlos Montero**

## INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2016 – 2018, se han volcado todos los informes finales de los grupos de investigación que desarrollaron sus tareas en ese lapso.

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

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



# IDENTIFICACIÓN POR PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA Y VALIDACIÓN DE EPITOPES PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA

Dr. Gonzalo Raúl Acevedo

INGEBI-CONICET

## Contextualización, hipótesis y objetivo del proyecto

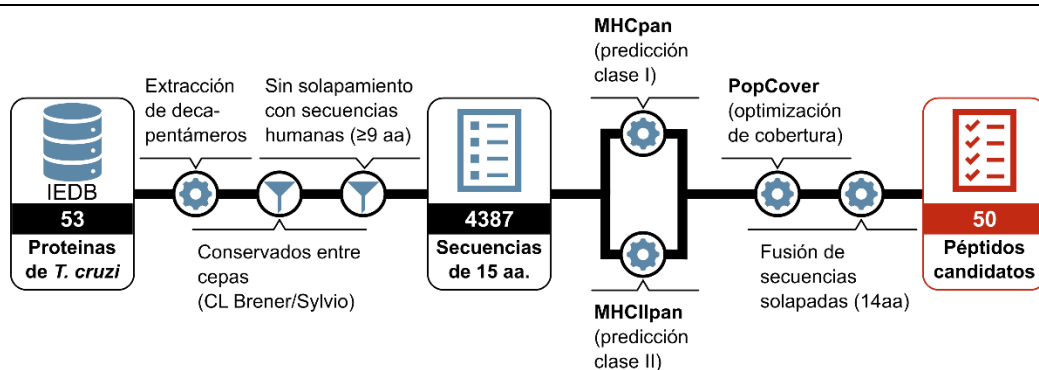
La respuesta mediada por linfocitos T juega un rol central en el control de la infección por *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, pero parece también estar involucrada en el desarrollo de las patologías asociadas a tal infección<sup>1</sup>. En ese sentido, es de interés el estudio de los linfocitos T para comprender los mecanismos de protección y patogénesis en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica. No obstante, la complejidad de la interacción entre el parásito y el hospedero dificultan la identificación y caracterización de los epitopes del parásito que activan a los linfocitos T y generan memoria inmunológica.

En este trabajo, abordamos esta dificultad mediante una aproximación basada en la predicción bioinformática de epitopes T como herramienta para seleccionar un conjunto limitado de péptidos de alto potencial inmunogénico. Éstos fueron utilizados para interrogar *in vitro* la respuesta inmune celular de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, clasificados según sus características clínicas. Asimismo, evaluamos el fenotipo de las células que respondieron frente a los péptidos predichos para conocer su grado de experiencia antigénica y maduración.

## Resultados

### Predicción bioinformática de epitopes de *T. cruzi*

A partir de las 53 secuencias de proteínas de *T. cruzi* registradas en la base de datos de inmunoepitopes (IEDB, <http://www.iedb.org>), se obtuvieron virtualmente todas las subsecuencias de 15 aminoácidos de longitud. Se seleccionaron aquellas conservadas entre las cepas filogenéticamente distantes<sup>2</sup> Sylvio X10 y CL Brener y se eliminaron aquellas similares a secuencias humanas. Sobre el resultado de este tamizaje, se emplearon los

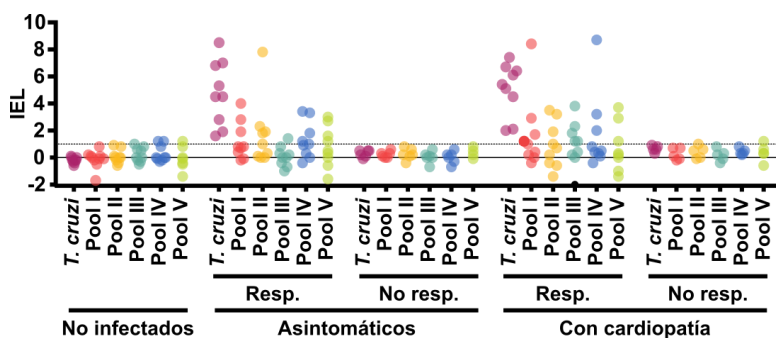


**Figura 1.** Diagrama de flujo de la estrategia bioinformática de predicción de epitopes

programas NetMHCpan<sup>3</sup> para la predicción de unión de los péptidos a las variantes de HLA-A y -B de mayor prevalencia en Latinoamérica, y NetMHCIIpan<sup>4</sup> para las variantes de HLA-DRB de mayor prevalencia mundial. Sobre las predicciones obtenidas, se aplicó el método PopCover<sup>5</sup>, de manera de priorizar las secuencias que se unirían a una mayor diversidad de variantes de HLA. Las 50 mejores secuencias se seleccionaron para su evaluación *in vitro*. El proceso descrito se esquematiza en la **Figura 1**.

### Evaluación de la respuesta de los pacientes frente a los epitopes predichos

Los péptidos seleccionados se sintetizaron y se aleatorizaron en 5 pools, que se usaron para desafiar, en experimentos de ELISPOT para IFN- $\gamma$ , muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMN) de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y sujetos no infectados como grupo control. Los resultados obtenidos permitieron agrupar a los pacientes de cada grupo según si evidenciaron o no una respuesta medible frente al lisado del parásito. Se observaron distintos grados de respuesta frente a las mezclas de péptidos entre los pacientes con enfermedad de Chagas, y notoriamente, los pacientes que respondieron frente a alguna de ellas agruparon dentro de la subcategoría con respuesta positiva frente al lisado del parásito (**Figura 2**). Esto sugiere una asociación entre la respuesta frente a los péptidos ensayados y una respuesta celular de memoria frente a los antígenos totales del parásito.



**Figura 2.** Evaluación de la respuesta frente a los péptidos seleccionados. IEL: índice de estimulación logarítmico.

Utilizando las muestras de células mononucleares de pacientes que habían demostrado reactividad frente a las mezclas de péptidos, se ensayaron los péptidos individuales en cada mezcla, validándose la existencia en los mismos de epitopes activadores de secreción de IFN- $\gamma$ . Se identificaron así 7 péptidos de *T. cruzi* capaces de activar los linfocitos T, que pertenecen a proteínas de la familia de las trans-sialidasas (TcTSp1 a TcTSp5) y a cruzipaina (TcCZp1 y TcCZp2). Vale destacar que los péptidos TcTSp1, TcTSp2 y TcCZp1 contienen secuencias que ya habían sido estudiadas<sup>6,7</sup> como activadoras de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

### Cobertura poblacional y restricción por HLA

Con el fin de estudiar la cobertura de la respuesta observada, se desafiaron las muestras de CMN de 51 pacientes con los 7 péptidos descritos anteriormente. Cada péptido alcanzó distintos niveles de cobertura poblacional, siendo los más frecuentemente reconocidos TcTSp4 y TcTSp5. La respuesta combinada de los 7 péptidos abarcó un 40%

de los pacientes asintomáticos y un 27% de los pacientes con cardiopatía. Globalmente, 1 de cada 3 pacientes presentó respuesta frente a al menos uno de los péptidos ensayados.

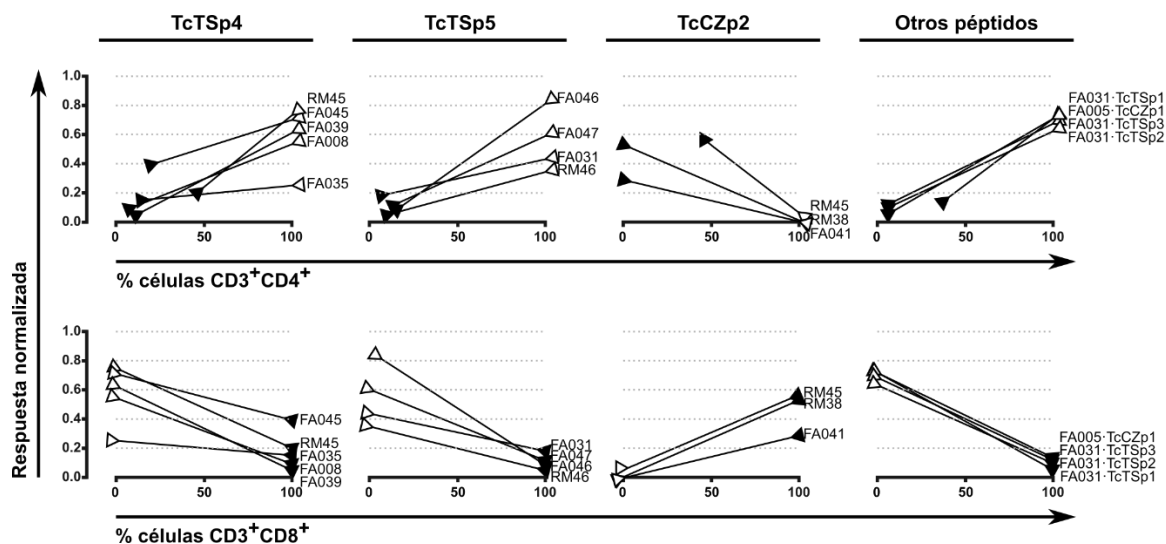
En adelante, nuestro interés se enfocó en caracterizar el tipo de respuesta que se produce por activación de las CMN de los pacientes. Utilizando un método de separación magnética de células, se realizaron experimentos de ELISPOT para IFN- $\gamma$  con CMN a las que se sustrajo los linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>) o citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), para evaluar la contribución de cada linaje a la respuesta detectada. Como se muestra en la **Figura 3**, los resultados sugieren que, de los 7 péptidos, 6 contienen epitopes que activan principalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup> (TcTSp1, TcTSp2, TcTSp3, TcTSp4, TcTSp5, TcCZp1), mientras que 1 contiene un epítipo activador principalmente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (TcCZp2).

Uno de los motivos que restringen la respuesta T, haciendo que algunos pacientes respondan frente a determinados epitopes mientras que otros, infectados con el mismo patógeno, no respondan, es la variabilidad genética de las moléculas de HLA. Éstas son cruciales para la presentación de antígenos a los linfocitos T, y por ende son determinantes del repertorio de epitopes T que generan memoria inmunológica en el contexto de una infección. Secuenciando los genes HLA de los pacientes y combinando esta información con predicción de epitopes, se pudo identificar, para la mayoría de los pacientes, los alelos que probablemente restringen la generación de una respuesta T de memoria frente a cada uno de los péptidos de este trabajo.

#### Características de las células epítipo-específicas

Para continuar con el estudio de la hipótesis de restricción por HLA, y para profundizar sobre las características de la respuesta T frente a los epitopes descritos, se diseñaron multímeros de MHC acoplados a péptidos, marcados con moléculas fluorescentes con el fin de detectar mediante citometría de flujo las células epítipo-específicas, y permitir así su caracterización. Se sintetizaron multímeros de HLA-A\*31:01 acoplado al núcleo de

unión del péptido TcCZp2 con dicho HLA (en adelante TcCZp2me). Esta herramienta se utilizó para analizar la frecuencia de las células específicas para el péptido que se encuentran *ex vivo* en las muestras de CMN (**Figura 4**). De los 8 pacientes HLA-A\*31:01<sup>+</sup> en la cohorte, sólo 3 presentaron frecuencias detectables de células específicas (**Figura 4B**). Estos mismos pacientes también habían mostrado secreción de IFN- $\gamma$  frente a este péptido en los anteriores experimentos de ELISPOT, mientras que los restantes 5 habían resultado negativos.



**Figura 3.** Respuesta frente a los péptidos en muestras de CMN a las que se sustrajeron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (triángulos vacíos) o los T CD8<sup>+</sup> (triángulos llenos). Los valores de unidades formadoras de *spot* fueron normalizados respecto de la respuesta observada en CMN totales en el mismo experimento. Los péptidos con menos de 3 pacientes con respuesta se agruparon en un único gráfico (“Otros péptidos”).

Para evaluar si en estos últimos existen células específicas en circulación, pero están presentes en frecuencias demasiado bajas para ser detectadas por citometría de flujo *ex vivo*, intentamos expandirlas *in vitro* por medio de la estimulación por 7 días<sup>8</sup> con el péptido TcCZp2me o con la versión completa TcCZp2 (**Figura 4B**). Como condición control, se sometieron las células al mismo protocolo de cultivo *in vitro* en ausencia de péptidos. Sólo para uno de los pacientes inicialmente negativos lograron detectarse células específicas luego del cultivo. Llamativamente, para los 2 de los pacientes que resultaron positivos *ex vivo* se observó una disminución en la frecuencia de estas células, y la disminución fue mayor frente a la incubación con los péptidos que en la condición sin estimular.

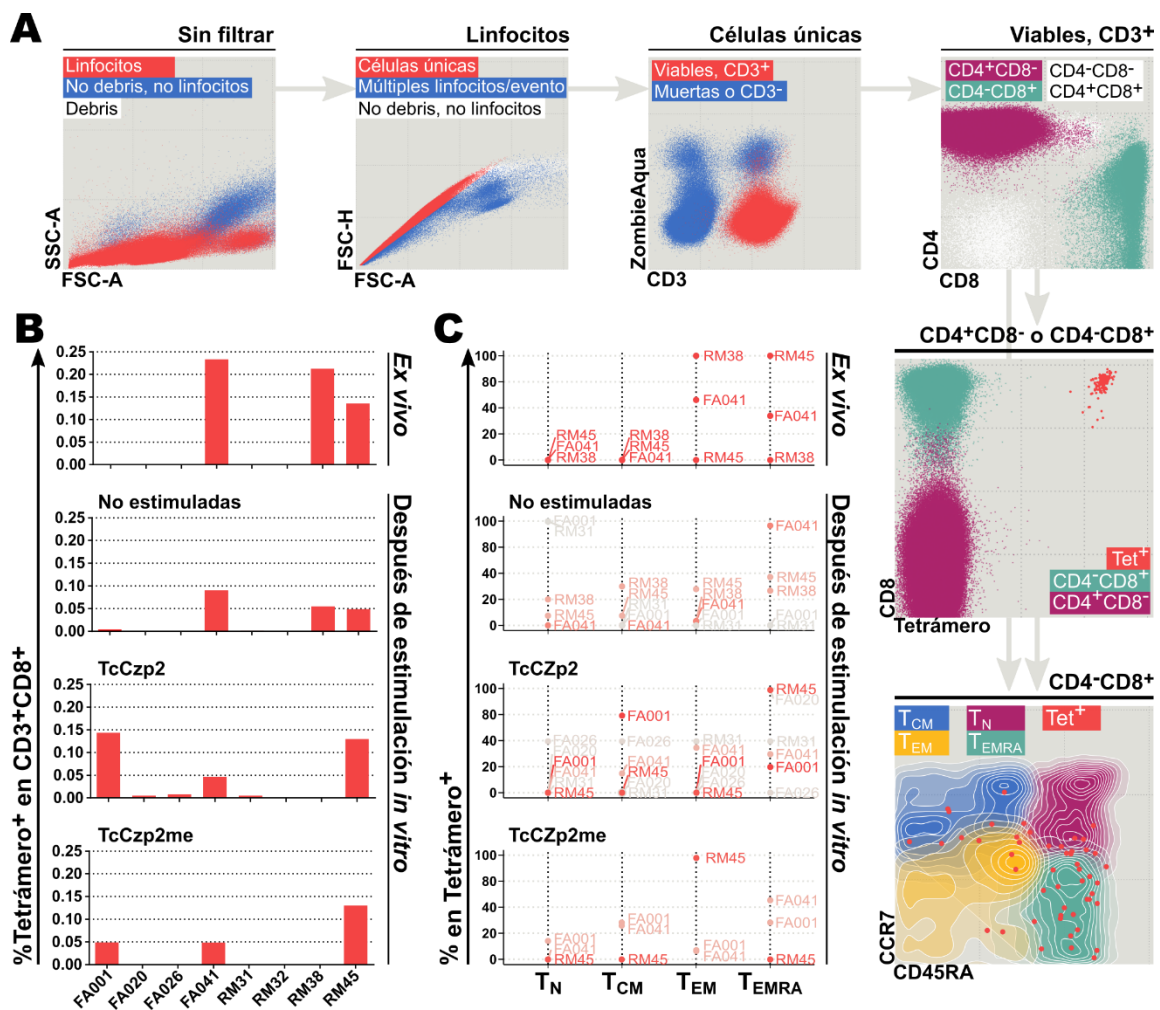
Además de analizar su abundancia, también se analizó el grado de experiencia antigénica de las células específicas utilizando los marcadores CD45RA y CCR7<sup>9-11</sup> (**Figura 4C**). De esta manera se determinó que las células específicas presentan diferentes fenotipos en cada paciente, y que estas permiten explicar el comportamiento diferente de estas poblaciones frente a la estimulación. Así, para el paciente en el cual las células se conservaron en presencia de los péptidos, éstas presentaban un fenotipo *ex vivo* predominante de células T<sub>EMRA</sub> (linfocitos T de memoria que re-expresan CD45RA, CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Por el contrario, en aquellos pacientes en los que las células se perdieron luego de la estimulación, el fenotipo predominante *ex vivo* fue de células T<sub>EM</sub> (linfocitos T de memoria efectora, CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>). En cuanto a las células específicas que se detectaron luego de la estimulación *in vitro* en el paciente inicialmente negativo, su fenotipo preponderante fue de células T<sub>CM</sub> (linfocitos T de memoria central, CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), lo cual es sugestivo de un origen *ex vivo* como linfocitos T vírgenes.

Como aproximación al estudio de las células CD4<sup>+</sup> activadas por algunos de los epítopes descritos en este trabajo, se realizaron ensayos de citometría de flujo con marcación intracitoplasmática de IFN- $\gamma$  en cultivos de CMN estimuladas con los péptidos correspondientes. Los resultados obtenidos permitieron la confirmación de lo observado en los experimentos con sustracción de poblaciones CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> ya mencionados, confirmando la capacidad de TcTSp4 y TcTSp5 como activadores de linfocitos T

colaboradores en 3 de los pacientes de la cohorte. En estos casos, se observó para el primer péptido una preponderancia de fenotipo T<sub>CM</sub> y, para el segundo, T<sub>EM</sub>.

## Conclusiones

En este trabajo, se utilizó una estrategia predictiva combinada con métodos *in vitro* de inmunología celular para descubrir 7 nuevos epitopes de *T. cruzi* que son reconocidos por linfocitos T de memoria de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Es destacable el aporte al conocimiento sobre la especificidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el contexto de esta enfermedad, un campo de estudio que se encuentra rezagado en comparación con la contraparte referida a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La tipificación de HLA de las muestras de pacientes permitieron la identificación de algunos alelos que restringen la presentación de estos epitopes, y por ende la generación de memoria inmunológica T frente a ellos, en el contexto de la infección. No obstante, se demuestra también que la restricción por HLA no es el único factor limitante en ese sentido. El estudio de las células específicas reveló que existen diferencias entre los distintos pacientes en cuanto al grado de maduración de las mismas, y que estas diferencias pueden relacionarse a comportamientos diferenciales en respuesta a la estimulación estímulo-específica, al menos *in vitro*. Finalmente, puesto



**Figura 4.** Cuantificación y análisis fenotípico por citometría de flujo de las células específicas para TcCZp2me en muestras de pacientes HLA-A\*31:01+. A. Estrategia de filtrado de los datos. B. Frecuencia de células específicas en las muestras *ex vivo* o luego de 7 días de cultivo *in vitro* bajo la condición de estimulación indicada. C. Fenotipo de las mismas células específicas.

que la combinación de los 7 péptidos alcanzó una cobertura máxima de 37.3% de la muestra poblacional, podría decirse que una estrategia de vacunación o inmunointervención basada en epítopes como los descubiertos en este trabajo requerirá muy probablemente la combinación de múltiples secuencias peptídicas inmunoreactivas para alcanzar una cobertura poblacional amplia.

### **Difusión de los resultados alcanzados**

Los datos generados durante el desarrollo de este proyecto dieron lugar a las siguientes comunicaciones en congresos y reuniones científicas:

\* **“Bioinformatically guided discovery of novel *Trypanosoma cruzi* epitopes recognised by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from chronic Chagas disease patients”**. Trabajo seleccionado para exposición oral. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. 13 a 17 de noviembre de 2017. Buenos Aires, Argentina.

\* **“Predicción bioinformática y validación de nuevos epítopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica”**. Trabajo seleccionado para exposición oral. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. 26 a 28 de noviembre de 2016. Ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

Asimismo, a pedido del comité organizador de la XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias (1° a 3 de Noviembre de 2018), el Dr. Acevedo brindó la charla titulada **“De la predicción in silico a la caracterización in vitro: epítopes de *Trypanosoma cruzi* activadores de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica”** en la mesa redonda de temática Inmunología.

Finalmente, se envió para su publicación en la revista **Frontiers in Immunology** un artículo, pendiente de decisión editorial, titulado **“In silico guided discovery of novel class I and II *T. cruzi* epitopes recognized by T cells from Chagas disease patients”**.

### **Premio**

Una versión parcial del trabajo presentado en este informe recibió, bajo el nombre **“Bioinformatically guided discovery of novel *Trypanosoma cruzi* epitopes recognised by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from chronic Chagas disease patients”**, y en el marco de la Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, el **Premio “Dr. Leonardo Satz” al mejor trabajo del año 2017 en Inmunología**, otorgado por la Sociedad Argentina de Inmunología.

## Bibliografía:

1. Acevedo, G. R., Girard, M. C. & Gómez, K. A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Front. Immunol.* (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.01929
2. Zingales, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 240–253 (2012).
3. Nielsen, M. *et al.* NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PLoS One* **2**, (2007).
4. Nielsen, M., Justesen, S., Lund, O., Lundegaard, C. & Buus, S. NetMHCIpan-2.0 - Improved pan-specific HLA-DR predictions using a novel concurrent alignment and weight optimization training procedure. *Immunome Res.* (2010). doi:10.1186/1745-7580-6-9
5. Lundegaard, C. & Perez, C. PopCover – A method for selecting of peptides with optimal Population and Pathogen Coverage. *BCB '10 Proc. First ACM Int. Conf. Bioinforma. Comput. Biol.* 658–659 (2010). doi:10.1145/1854776.1854905
6. Fonseca, S. G. *et al.* Identification of multiple HLA-A\*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8<sup>+</sup> epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect.* **7**, 688–697 (2005).
7. Martin, D. *et al.* CD8<sup>+</sup> T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog.* **2**, 0731–0740 (2006).
8. Acevedo, G. R. *et al.* Methodological approach to the *ex vivo* expansion and detection of *T. cruzi* -specific T cells from chronic Chagas disease patients. *PLoS One* 1–19 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0178380
9. Appay, V., van Lier, R. A. W., Sallusto, F. & Roederer, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom. Part A* **73A**, 975–983 (2008).
10. Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A. J. & Callan, M. F. C. Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets. *J. Immunol.* **175**, 5895–5903 (2014).
11. Tian, Y. *et al.* Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-01728-5

## Abstract

T cell-mediated response plays a crucial role in controlling *T. cruzi* infection and parasite burden, but it also seems to be involved in the clinical onset and progression of chronic Chagas disease. Therefore, the study of T cells is central to the understanding of the immune response against the parasite and its implications for the infected organism. The complexity of the parasite-host interactions hampers the identification and characterization of T cell activating epitopes. We approached this issue by combining *in silico* and *in vitro* methods to interrogate patients' T cells specificity. Fifty *T. cruzi* peptides predicted to bind a broad range of class I and II HLA molecules were selected for *in vitro* screening against PBMC samples from a cohort of chronic Chagas disease patients, using IFN- $\gamma$  secretion as a readout. Seven of these peptides were shown to activate this type of T cell response, and four out of these contain class I and II epitopes that are first described here. The remaining 3 contain sequences that had been previously reported to induce CD8<sup>+</sup> T cell response in Chagas disease patients, or bind HLA-A\*02:01, but are here demonstrated to engage CD4<sup>+</sup> T cells as well. We also assessed the degree of differentiation of activated T cells, and looked into the HLA variants that might restrict the recognition of these peptides in the context of human *T. cruzi* infection.



# AISLAMIENTO DE BOCAVIRUS EN CULTIVO A PARTIR DE MUESTRAS RESPIRATORIAS DE NIÑOS HOSPITALIZADOS POR NEUMONÍA

Lucía María Ghietto, Ana Paola Toigo D'Angelo, Franco Viale, Sabrina Ximena Rivadera, María Pilar Adamo

Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas,  
Universidad Nacional de Córdoba

## Síntesis

**Introducción.** La infección respiratoria aguda baja representa una carga sustancial para los servicios de salud, ya que es una de las principales causas de morbilidad en el mundo y de mortalidad infantil, particularmente en países en desarrollo. Uno de los más recientemente identificados agentes respiratorios es el bocavirus humano 1 (HBoV1), con una alta frecuencia de detección en niños, en los que puede asociarse a bronquiolitis y neumonía. Aún no se conoce la historia natural de la infección ni los mecanismos patogénicos. Sin embargo, se ha detectado al virus en suero, por lo que no sería un patógeno respiratorio estricto. Además la presencia de ADN viral en tejidos de adenoides, amígdalas y tumor de pulmón y colon sugiere la capacidad del virus de infectar distintos tipos celulares. En un estudio anterior logramos infectar con HBoV1 cultivos de células Caco-2 (una línea establecida de células epiteliales humanas derivada de adenocarcinoma colorrectal). Por lo tanto, el objetivo en este estudio fue identificar muestras respiratorias bocavirus-positivas de lactantes hospitalizados con neumonía y caracterizar la infección de células Caco-2 por HBoV1.

**Métodos.** El screening de HBoV1 se realizó a partir de extractos de ácidos nucleicos obtenidos de aspirados nasofaríngeos (ANF) de lactantes hospitalizados por neumonía, mediante PCR. Las muestras positivas sin codetecciones de otros agentes respiratorios fueron secuenciadas y cuantificadas mediante qPCR. Con las muestras confirmadas se prepararon inóculos de HBoV1 para cultivo, mediante dilución de 100 µL de ANF con 9,9 mL de medio de cultivo estéril, agitación en vórtex con perlas de vidrio, centrifugación y filtración del sobrenadante, el cual fue conservado fraccionado a -70°C. Se prepararon cultivos de células Caco-2 (ATCC® HTB-37), monocapas y cultivos polarizados, que fueron infectados con el inóculo viral en presencia de DEAE-dextrán. Para corroborar la infección en los cultivos se recolectaron alícuotas del medio sobrenadante y de las células a intervalos regulares (horas / días postinfección, hpi y dpi respectivamente), en los que se determinó el genoma viral por PCR y qPCR. Además, los cultivos fueron fijados y teñidos con hematoxilina y eosina para determinar la aparición de efecto citopático (ECP) y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (IF) para detectar las proteínas virales estructurales / no estructurales con un pool de sueros humanos. Finalmente, a fin de comparar la progenie generada in vitro con la cepa infectante se secuenció el genoma completo del inóculo y de las muestras positivas de sobrenadantes y células de cultivos, mediante amplificación con primers dirigidos a 8

fragmentos consecutivos y superpuestos. Los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo los correspondientes controles y se evaluó la significancia estadística de las diferencias observadas mediante análisis de varianza ( $\alpha < 0,05$ ).

**Resultados.** De 185 ANF, 14 resultaron positivos para HBoV1. De ellos, 9 tenían coinfección con otros virus del panel diagnóstico (IF y PCR), resultando 5 muestras potenciales para producción de inóculos. La secuenciación corroboró la identidad de HBoV1, así como la qPCR, detectándose dos extractos con alta carga viral de HBoV1 ( $>1 \times 10^6$  copias de ADN viral/ $\mu\text{L}$ ), uno con carga viral intermedia (entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^6$  copias/ $\mu\text{L}$ ) y los dos restantes con carga viral baja ( $<1 \times 10^4$  copias/ $\mu\text{L}$ ). En los ensayos de infección de células Caco-2 se detectó HBoV1 en el 100% de las muestras tomadas de sobrenadantes y células 1 a 6 dpi, no así en muestras análogas de células Vero usadas como control. Los cultivos infectados (células en monocapa o células diferenciadas / polarizadas en multicapas) no mostraron ECP ni disminución en la supervivencia celular, sin embargo las pruebas de cuantificación del ADN viral demostraron que su concentración aumentó de 3 a 4 log luego de 24 hpi ( $p=0.0004$ ). Asimismo, los ensayos de IF permitieron detectar un patrón de fluorescencia puntiforme localizado en la región perinuclear de las células. Este patrón se detectó consistentemente en focos dispersos en cultivos infectados pero no se observó en los cultivos de control. Por otra parte, los ensayos de captura o agotamiento de anticuerpos, en los que se permitió que los anticuerpos presentes en el pool de sueros reaccionaran con las partículas / proteínas virales presentes en el medio sobrenadante y en el lisado celular de monocapas Caco-2 infectadas previo a la prueba de IF, demostraron que este pretratamiento suprime el patrón de IF descrito. Para determinar si el virus puede establecer una infección crónica, se realizó una serie de pasajes ciegos a partir de un cultivo inicial inoculado. En sobrenadantes y células de los pasajes ciegos no se detectó HBoV1 por PCR, siendo los sobrenadantes y monocapas de los cultivos iniciales positivos. Por otro lado, en cultivos frescos inoculados a 24-48 h post siembra de las células (50-70% de cobertura) mantenidos a 37°C con DEAE produjeron virus que pudieron demostrarse en las células (multicapas polarizadas) luego de 4 semanas de cultivo (80 copias de ADN/ $\mu\text{l}$  a 28 dpi), sin ECP ni detección del virus en el sobrenadante. En las pruebas de secuenciación de genoma completo del virus detectado en cultivo a 6 dpi, respecto al sobrenadante se obtuvo una secuencia incompleta, representada por dos segmentos, uno correspondiente al extremo 5' (nucleótidos 1 a 1937, número de acceso en GenBank KY629422) y otro correspondiente a un segmento intermedio, del nucleótido 2407 a 4277 (KY629423), faltando dos fragmentos (nucleótidos 1938 a 2406 y el extremo terminal 3' a partir del nucleótido 4278). Estos fragmentos faltantes se localizan en los genes NS1 y VP1/VP2, respectivamente. El virus en la monocapa fue secuenciado completamente (KY629421). Cuando las secuencias obtenidas de la monocapa y el sobrenadante se compararon con la cepa de HBoV1 infectante (presente en la muestra clínica, KJ634207), se detectaron 33 mutaciones, todas ubicadas en genes no estructurales y principalmente en la secuencia NS1. Estos cambios de nucleótidos se asociaron con mutaciones en 17 aminoácidos en el virus del sobrenadante, y dos de ellas fueron cambios de A a T que condujeron a la aparición de codones stop. En la monocapa se detectaron cuatro mutaciones aminoacídicas. Una de ellas, en la posición de aminoácido 606 (NS1 nt 1816-1818) fue un cambio C-G que reemplaza la tirosina original con un codón stop, lo que produciría una proteína truncada en la que faltan 34 aminoácidos en el extremo C-terminal.

**Conclusiones.** En este trabajo se logró aislar el virus en cultivos de células Caco-2 a partir de ANF de niños con neumonía, utilizando DEAE-dextrán, un compuesto facilitador de la adsorción en células permisivas. Demostramos la infección por HBoV1 en cultivos de células Caco-2 mediante la detección del genoma viral en las células y en el medio sobrenadante 1 a 6 dpi, el aumento significativo en la concentración de ADN viral desde el día 1 postinfección y un patrón distintivo de inmunofluorescencia usando anticuerpos policlonales, que evidencian las proteínas del virus en los sitios de replicación desde el día 1 de la infección in vitro. Estos resultados indican la ocurrencia de un ciclo de replicación de rápido desarrollo en estas células. Además, corroboramos el genoma del virus en cultivo secuenciando el ADN viral detectado en el sobrenadante y en la monocapa, evidenciando mutaciones críticas en la región de la enzima viral multifuncional NS1 (implicada en la transcripción, la replicación y el empaquetado del genoma). A pesar de la replicación de HBoV1 en células Caco-2 después de la inoculación de material respiratorio en las condiciones estudiadas, la progenie viral no es capaz de producir ciclos replicativos completos posteriores, lo cual podría ser consecuencia de múltiples mecanismos, incluyendo la ocurrencia de mutaciones deletéreas en la proteína replicativa NS1, conducente a la generación de partículas defectuosas interferentes, y la potencial inhibición por parte de la respuesta de interferón, que es funcional en estas células. Futuras investigaciones contribuirán a elucidar detalles de estas observaciones.

**Palabras clave:** Bocaparvovirus primate 1; neumonía; aislamiento; replicación viral; secuencia.

## ABSTRACT

Human bocavirus 1 (HBoV1) is a parvovirus associated with acute respiratory infection and has been demonstrated in respiratory clinical specimens of infant patients with bronchiolitis and pneumonia. This virus was the first to be identified in a group now classified in two species (the “respiratory” virus and a cluster of “enteric” viruses that have not yet been related to gastrointestinal disease). HBoV1, in addition to the airway and respiratory tract, has been detected in different tissues, including adenoids, tonsils and colorectal tumors. In this study, we isolated HBoV1 from nasopharyngeal aspirates of infants hospitalized with pneumonia and investigated whether Caco-2 cell line, derived from human colon cancer, can be utilized as a model for HBoV1 replication. We demonstrate HBoV1 replication in Caco-2 cultures supplemented with DEAE-dextran. A viral cycle of rapid development is displayed. However, in spite of HBoV1 DNA 4-fold increment in the supernatants and monolayers by day 1 ( $p < 0.0004$ ), evidencing that the system allows the virus genome replication after the entry occurred, infectious progeny particles in subsequent bind passages were not produced. Immunofluorescence detection and antibody-depletion assays showed a likely immunofluorescent pattern, consisting of foci of infected cells displaying a spotted arrangement mainly located in the perinuclear region. The results are consistent with an infection that is limited to a single growth cycle, which can be associated to mutations in the NS1 region of HBoV1 genome. While further research will contribute to fully elucidate these observations, our results indicate that these cultures can be useful for research on HBoV1, in particular referring to the virus receptor and virus-cell interactions.

**Key words:** Primate bocaparvovirus 1; pneumonia; isolation; virus replication; sequence.

# MODULACIÓN DEL SECRETOMA TUMORAL DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (ALL) ANTE EL ESTÍMULO DE HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

Mariana Andrea Amorós, Dra. Graciela A. Cremaschi, Dra. Graciela Klein,  
Bioq. María Eugenia Padín

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)

## RESUMEN

Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) son una población celular heterogénea residente del estroma de diversos tejidos. Sus propiedades funcionales incluyen la inmunomodulación, migración y secreción de factores paracrinos convirtiéndolas en moduladoras clave de su microambiente. En patologías oncohematológicas, las MSCs derivadas de médula ósea comparten un mismo nicho de origen con las células blásticas tumorales y exhiben un perfil preponderantemente leucemogénico. Su uso en trasplantes hematopoyéticos es relevante para pacientes leucémicos vulnerables o de alto riesgo, ya que pueden actuar favoreciendo el incremento de plaquetas y mielopoyesis. Sin embargo, su uso ha sido vinculado con la recaída de dichos pacientes trasplantados, por posibles recidivas tumorales durmientes, que podrían ser protegidas y activadas tras la administración de MSCs. Esto muestra la necesidad de una profunda comprensión del comportamiento de las MSCs en los desórdenes oncohematológicos. Otro factor asociado a la progresión oncohematológica son las Hormonas Tiroideas (THs). Su mecanismo de acción se encuentra mediado por dos vías de señalización, la canónica (receptores nucleares, TRs) y la no-canónica (receptores de membrana, Integrina  $\alpha\beta3$ ), cuyos efectos sobre el secretoma tumoral no han sido estudiados en profundidad. Proponemos evaluar, utilizando un modelo de Leucemia Linfoblástica T, los efectos moduladores del secretoma tumoral obtenido en presencia de THs sobre las MSCs. Esperamos aportar las bases para el estudio de un mecanismo novedoso que podría regular la progresión tumoral inducida por factores endócrinos que median la actividad de las MSCs.

## OBJETIVOS

**Objetivo 1:** Evaluar el perfil migratorio *in vitro* de las MSCs ante el secretoma tumoral de células CUTLL1 previamente estimuladas por THs.

**Objetivo 2:** Evaluar los niveles de adhesión de las MSCs ante el secretoma tumoral CUTLL1 previamente estimulado por THs.

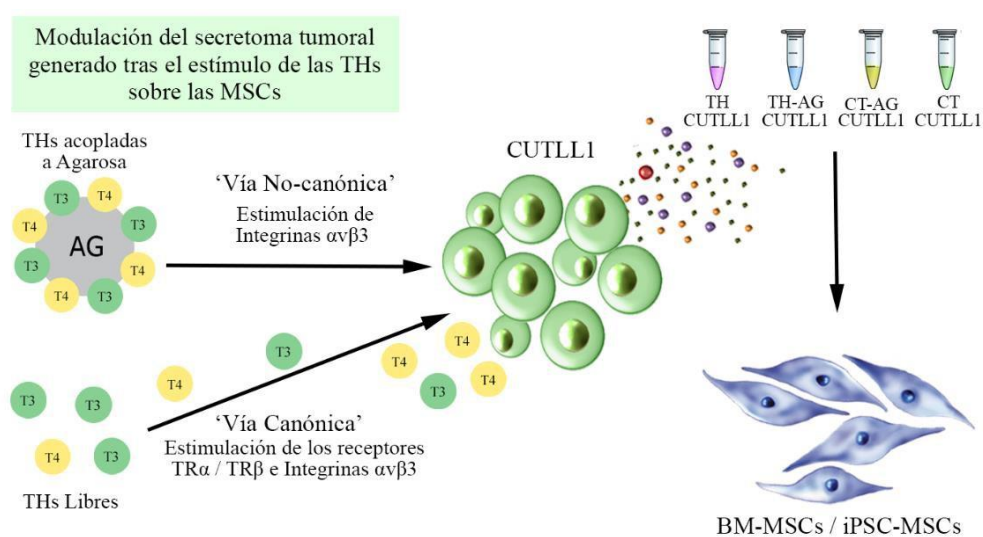
**Objetivo 3:** Evaluar el nivel de proliferación de las MSCs ante el secretoma tumoral CUTLL1 previamente estimulado por THs.

**Objetivo 3:** Evaluar los niveles de diferenciación de las MSCs ante el secretoma tumoral de células CUTLL1.

## MODELO PROPUESTO

Se utilizaron tanto Células Madre Mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSCs) provenientes de donantes sanos para trasplante hematopoyético, como también, Células Madre Mesenquimales derivadas de Células Inducidas a Pluripotencia (iPSC-MSCs). La elección de las BM-MSCs se sustenta en su relación física con los blástos neoplásicos, que comparten un mismo nicho medular; y por su documentada actividad leucemogénica, vinculada al relapso de pacientes leucémicos trasplantados. El uso de las iPSC-MSCs se plantea como modelo relevante a fin de conocer si los efectos hormonales pueden darse en MSCs de otro origen.

El modelo tumoral de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo T (T-ALL) es representado por la línea celular CUTLL1. Los estudios de la modulación ejercida por las THs se realizaron utilizando concentraciones fisiológicas (T3 1 nM / T4 100 nM) adicionadas en forma directa sobre los cultivos celulares. La vía no-canónica (Integrina  $\alpha\beta3$ ) fue estudiada mediante el uso de hormonas acopladas a esferas de agarosas (T3-AG / T4-AG), incapaces de atravesar la membrana plasmática (Figura 1).



**Figura 1. Modelo para el estudio *in vitro* del secretoma tumoral previamente modulado por THs sobre las MSCs.** Ilustración Científica: Mariana A. Amorós ©.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Técnicas Generales de Cultivo Celular

#### 1.1. Materiales y Reactivos generales para el manejo de cultivos celulares

Los medios de cultivos fueron preparados según instrucciones del fabricante y su esterilización se realizó mediante filtros de nitrocelulosa [0,22  $\mu\text{m}$ ; (Jet Bio-Filtration Co.)]. Los suplementos y drogas de pequeño volumen fueron esterilizados con filtros para jeringas de nylon [0,22  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$ ; (Jet Bio-Filtration Co.)]. Los tips para micropipetas [10  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ ; (Biopointe Scientific)] y microtubos [1 ml, 1,5 ml; (Axygen Scientific)] fueron esterilizados por autoclave. Las pipetas graduadas fueron o bien descartables [1 ml, 5 ml, 25 ml y 50 ml; (Jet Bio-Filtration Co.)] o de vidrio esterilizadas por autoclave (o estufa a 180  $^{\circ}\text{C}$ ). Los tubos de reacción [15 ml, 50 ml; (Jet Bio-Filtration Co.)], placas de cultivo [p100, p150; (Greiner Cellstar, Sigma-Aldrich)], Placas de múltiples pocillos [MW6, MW12, MW24, MW96; (Jet Bio-Filtration Co.)], y botellas para cultivo [T25, T75, T175; (Jet Bio-Filtration Co.)] fueron descartables. El material descartable rehusado tras esterilización por irradiación se limitó a ser destinado a la mantención y expansión de cultivos. El manejo de cultivos celulares se llevó a cabo en campana de bioseguridad tipo II (1300 A2 series, Thermo Scientific), en condiciones de esterilidad con uso de guantes, barbijo y cofia.

Dado que el presente trabajo involucra modulación hormonal, el tipo de suero fetal

bovino (SFB) y sus condiciones al momento de uso resulta un factor determinante para la obtención de resultados verosímiles. Por tanto, los niveles de THs fueron analizados mediante radioinmunoensayos (RIA). El suero utilizado fue Gibco y para aquellos ensayos que requirieron estimulación hormonal, los cultivos fueron sometidos a un mínimo de 16 h de ayuno / hambre; minimizando los estímulos hormonales inducidos por el suero. Para los casos en los que el experimento requirió el SFB y estimulación hormonal, se recurrió al uso de suero humano depletado de hormonas, Sunnyslab (Rainham, Reino Unido).

## **1.2. Mantenimiento general de cultivos celulares**

Los cultivos utilizados fueron incubados en sus respectivos medios de cultivo en estufa de cultivo (Forma Series II, Thermo Scientific) a 37 °C, atmósfera saturada de agua y 5 % de CO<sub>2</sub>. Para la cuantificación de células, se utilizó cámara de Neubauer (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Germany) y para estimar la viabilidad general se utilizó el colorante vital Trypan Blue (T6146 Sigma).

Todos los cultivos fueron sometidos a controles institucionales por contaminación de *Mycoplasma* (*mycoplasma sp*) mediante Plasmotest (InvivoGen, CA, USA), o bien, en forma rutinaria mediante visualización fluorescente de Hoechst 33342 [0,1 µg/ml, (Molecular Probes, Invitrogen)]. Para el último caso y brevemente, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos [12 mm de diámetro (NeuVibro; Alemania)] previamente esterilizados y acomodados en placa de cultivo de 24 pocillos. Tras su adhesión, las células se fijaron en Paraformaldehído 4 % [PFA; (Sigma-Aldrich)] y fueron teñidas por 20 min en cámara fría a 4 °C. Los cubreobjetos fueron lavados y montados sobre portaobjetos (Sail Brand, No. 7105) con medio de montaje Gelvatol [Alcohol polivinílico; (341584, Sigma- Aldrich)].

De cada tipo celular, se generó un stock criopreservado a -200 °C en N<sub>2</sub> líquido. Brevemente, los cultivos de células adherentes fueron lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) y tratados con Tripsina/EDTA (Gibco, Life Technologies) durante un tiempo mínimo de 4 min; dicha reacción enzimática se detuvo con SFB (Internegocios S.A.) de calidad biotecnológica. Las células recolectadas en suspensión; o bien aspiradas en forma directa de cultivos no adherentes, fueron centrifugadas (IEC CL30, Thermo Scientific) a 161 g por 5 min, cuantificadas y resuspendidas en SFB con el aditivo del crioprotector Dimetil Sulfoxido [DMSO; (W387509, Sigma-Aldrich)] en crioviales (Cryo.s Leak proof). Dichos crioviales fueron atemperados a -80 °C durante 48 h antes de ser trasladados al tanque de nitrógeno para almacenamiento (Taylor Wharton). Para su descongelamiento, los crioviales fueron sometidos a un rápido baño de agua a 37 °C y su contenido inmediatamente volcado en tubos de reacción de 15 ml con 5 ml de medio completo antes de ser centrifugados a 112 g durante 5 min. El pellet obtenido plaqueado acorde a la cantidad de células viables contadas.

## **2. Líneas Celulares y Cultivos Primarios**

---

### **2.1. Células Madre / Estromales Mesenquimales derivadas de médula ósea (BM- MSCs)**

Los cultivos primarios de BM-MSCs utilizados fueron establecidos y caracterizados por el grupo del Dr. Correa-Domínguez (ICC-FIOCRUZ, PR, BR) (Angulski *et al.*, 2017). Los mismos fueron utilizados en sub-pasajes menores al quinto y cultivados a baja densidad (3,000 células / cm<sup>2</sup>). Las muestras utilizadas procedieron de un donante sano para trasplante de médula ósea con consentimiento informado en acuerdo con las normas internacionales vigentes. Las células fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium [(DMEM); Gibco, Life Technologies] bajo en glucosa, y suplementados con 10 % SFB, 100 U/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina (Gibco, Life Technologies) y 2 mM L-Glutamina (Gibco, Life Technologies).

### **2.2. Células Madre / Estromales Mesenquimales derivadas de Células Madre inducidas a Pluripotencia (iPSC-MSCs)**

Los cultivos de iPSC-MSCs fueron establecidos por el grupo del Dr. Miriuka

(FLENI, CONICET). Los mismos proceden de células fibroblásticas humanas aisladas de prepucio, desdiferenciadas a Células Madre Inducidas a Pluripotencia (iPSCs) y diferenciadas posteriormente a MSCs mediante un protocolo de grado-terapéutico (Luzzani *et al.*, 2015). Esta línea fue mantenida en DMEM (Gibco, Life Technologies) bajo en glucosa, 20 % SFB, 100 U/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina (Gibco, Life Technologies) y 2 mM L-Glutamina (Gibco, Life Technologies) según su recomendación.

### **2.3. Células de Linfoma Linfoblástica T (Columbia University T-cell Lymphoblastic Lymphoma 1; CUTLL1)**

La línea CUTLL1 fue cedida por el Dr. Cerchietti (Weill Cornell Medical Center College, USA). Dicho cultivo fue establecido a partir de células provenientes de una efusión pleural de un paciente donante pediátrico que al momento, se encontraba transitando una recaída de su desorden Linfoblástico T. Las características del cultivo celular son de relevancia para ensayos pre-clínicos y farmacológicos dada su respuesta celular vinculada a la inhibición por vía NOTCH, asociada a su etiología (Palomero *et al.*, 2006). Los cultivos de CUTLL1 crecen en suspensión, con un tiempo de duplicación de 24 h. Los mismos fueron mantenidos en Roswell Park Memorial Institute Medium [RPMI; (Gibco, Life Technologies)] suplementado con 10 % SFB, 100 U/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina (Gibco, Life Technologies) y 2 mM Glutamina (Gibco, Life Technologies).

## **3. Hormonas Tiroideas**

---

### **3.1. Acoplamiento de Hormonas Tiroideas a Esferas de Agarosa**

El acoplamiento de las THs, tanto de T3 como de T4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI) a esferas de agarosa (AG) fue realizado por el Dr. Ricardo Farías (Departamento de Bioquímica Nutricional, UNT-CONICET, Tucumán) utilizando cromatografía de afinidad [N-Hydroxysuccinimide-Sepharose activated 4 Fast Flow; (GE Healthcare, ex Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)]. Dicho acoplamiento es producto de la reacción entre el ester activado de las esferas de agarosa con los grupos aminos primarios de las hormonas, formando así un link amido mediante un brazo espaciador de 14 átomos (Barreiro Arcos *et al.*, 2011).

La contaminación por hormona libre tras su unión con agarosa fue analizada mediante RIA, probando ser menor a 1 mol de THs por cada  $10^5$  moles o  $10^4$  moles de hormona acoplada a agarosa (TH-AG). La estabilidad de dichos conjugados hormonales fue analizada en el sobrenadante de cultivos tratados durante 24 h, resultando en la falta de detección de THs (Barreiro Arcos *et al.*, 2011; Cayrol *et al.*, 2015).

### **3.2. Estimulación de cultivos celulares con Hormonas Tiroideas**

Los cultivos celulares, ya sean BM-MSCs o iPSC-MSCs, fueron estimulados por concentraciones fisiológicas y conjuntas de T3 (1 nM) y T4 (100 nM). El régimen de estimulación fue puesto a punto para periodos de 24 h y 48 h, reemplazando las concentraciones de hormonas con cada cambio de medio. El mismo régimen fue utilizado para la estimulación con TH-AG y a modo de control se utilizaron esferas de agarosa libres (CT-AG).

## **4. Producción de Medios Condicionados (MC)**

---



Los MC de cultivos celulares fueron obtenidos a partir de las CUTLL1 tras alcanzar confluencia del 90 %. Previo a las 24 h de estimulación hormonal, a concentraciones y tiempos previamente descritos (Sección 3.2), las células fueron sometidas a ayuno / hambreado de SFB. Los medios condicionados así generados, fueron recolectados y centrifugados a 931 g por 10 min a - 4 °C. Esto permitió remover a las células y al debrís presente. La concentración de T3 y T4 en los MC así obtenidos fue menor al límite de detección del ensayo usado para su medición (Immulite 1000 immunoassay system, Siemens). Pequeñas alícuotas de los mismos fueron almacenados a - 80 °C para ser utilizados a corto o mediano plazo (6 - 8 meses) evitando descongelar la misma alícuota en oportunidades reiteradas.

## **5. Ensayos de Migración *in vitro***

---

La capacidad de inducir una respuesta quimiotáctica *in vitro*, ante medios condicionados fue evaluada mediante ensayos de migración en cámara modificada de Boyden (#AP48 Neuroprobe, Inc.). Los cultivos de MSCs fueron hambreados y migrados frente al MC CUTLL1 previamente estimulado por hormonas. Las células fueron sembradas en la cámara superior a una concentración de  $12 \times 10^3$  células / 50  $\mu$ l DMEM por pocillo y el quimiotractante se sembró en alícuotas de 28,4  $\mu$ l / pocillo en la cámara inferior. Se utilizaron los controles experimentales correspondientes, siendo SFB 10 % (control positivo) y medio basal DMEM (control negativo). Entre ambas cámaras se acomodó una membrana de Policarbonato con poros de 8  $\mu$ m (Neuroprobe, Inc.). Tras 4 h de incubación estándar, la membrana fue extraída y fijada en PFA 4 %. Las células no migrantes fueron removidas y aquellas migrantes fueron teñidas con Hoechst [0,1  $\mu$ g/ml; (Molecular Probes, Invitrogen)] durante 30 min. La membrana así teñida fue montada entre dos portaobjetos con medio de montaje Gelvatol (341584, Sigma-Aldrich). Para la cuantificación celular, se tomaron imágenes digitales utilizando microscopía de fluorescencia capturando 2 campos por pocillo (cubriendo un área del 85 % - 90 % del total). Para cada tratamiento corresponden 3 pocillos de réplicas técnicas, resultando en 6 imágenes por tratamiento. Los núcleos fueron cuantificados en CellProfiler (Copyright 2009-2013, Broad Institute) identificados en base a su forma, tamaño e intensidad de la señal emitida por Hoechst. El análisis estadístico se realizó utilizando el promedio de la suma de los núcleos contados en un tratamiento.

## **6. Ensayos de Adhesión Celular**

---

Tanto las BM-MSC como iPSC-MSC fueron hambreadas por 24 h y sembradas a  $2 \times 10^4$  células /  $\text{cm}^2$  en placa de 96 pocillos, previamente cubiertos con Vitronectina [250 ng/ml; (Sigma-Aldrich)]. El ensayo se realizó en presencia de MC CUTLL1 (1:1) medio basal DMEM, modulado o no por THs. Se utilizaron los controles experimentales correspondientes, SFB 10 % (control positivo) y medio basal DMEM (control negativo). Se evaluaron 3 puntos en el tiempo: 5 min, 15 min y 30 min. Al finalizar cada tiempo, las células no adheridas fueron descartadas por volcado, y aquellas adheridas se fijaron en PFA 4 % y tiñeron con Hoechst [0,1  $\mu$ g/ml; (Molecular Probes, Invitrogen)]. En el caso de las células iPSC-MSCs se tomaron fotografías utilizando microscopía de fluorescencia y se cuantificó con CellProfiler Software (Copyright 2009-2013, Broad Institute). Para los ensayos con las BM-MSCs, las placas fueron analizadas mediante el Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer Inc.; UK) y los datos analizados por Harmony (PerkinElmer Inc.; UK). Los datos así procesados fueron graficados como el área bajo la curva.

## **7. Ensayo de Proliferación mediante incorporación de Timidina Triterada**

---

Para los ensayos de incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina, las iPSC-MSCs fueron plaqueadas a 7,000 células/ $\text{cm}^2$  en placa de 96 pocillos, con cada tratamiento por triplicado y los experimentos se repitieron 4 veces. Las células fueron incubadas por 72

h, con cambio de medio cada 24 h, siendo estimuladas con MC de CUTLL1 previamente estimulado (o no) por hormonas. A modo de control, se utilizaron las variables de medio basal DMEM (control negativo) y VEGF (control positivo). Previo a las 18 h de finalizar el experimento se incorporó la [3H]-timidina [(NET 027E; actividad específica: 20 Ci-mmol<sup>-1</sup>); Dupont- New England Nuclear, Boston, MA, USA] a concentración final de 0,3 uCi/pocillo. Para el análisis de las placas, los pocillos fueron lavados con PBS y las células tripsinizadas y los pocillos cosechados. Se midió la incorporación de [3H]-timidina por centelleo líquido (Optiphase 'Hisafe' 3, Wallac, Turku, Finland) en un analizador de centelleo líquido (Tri- Carb 2800TR, PerkinElmer Inc.).

## **8. Ensayo de inmunofluorescencia para detección de Ki67**

---

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para detección de Ki67 a fin de evaluar la proliferación de las BM-MSCs. Dicho ensayo se realizó por triplicado en placas de 96 pocillos. Para ello, las células fueron plaqueadas a 5,500 células / cm<sup>2</sup>, siendo estimuladas durante 24 h con el MC CUTLL1 previamente estimulado (o no) por hormonas. Se utilizaron los correspondientes controles, medio DMEM (control negativo) y SFB 10 % (control positivo). Finalizada la estimulación, los pocillos fueron lavados y las células fijadas con PFA 4 % por 20 min. Las células fueron permeabilizadas con Tritón 0,5 % / PBS por 30 min y se bloqueó con Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1 % durante 1 h. El anticuerpo primario Ki67 (1:300) (ab15580, Abcam, IgG) se incubó por 1 h. El anticuerpo secundario, Alexa 594 anti-rabbit (1:600) (Z25307, Invitrogen) se incubó por 40 min. Los núcleos se tiñeron con Hoechst [0,1 µg/ml; (Molecular Probes, Invitrogen)] por 40 min y las placas se analizaron utilizando Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer Inc.; UK). Los parámetros de análisis fueron programados para contar el número de células totales por pocillo y la señal de Ki67 emitida sólo dentro del núcleo de las células (no se registró señal emitida en forma inespecífica). El análisis y la cuantificación se realizaron con Harmony (PerkinElmer Inc.; UK).

## **9. Ensayos de Diferenciación Celular de BM-MSC**

---

Las BM-MSC fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1x10<sup>4</sup> células / cm<sup>2</sup> y estimuladas por MC CUTLL1 (1:1) con el medio de inducción de diferenciación o solo el medio de diferenciación (control negativo). Los ensayos fueron sostenidos por un lapso de 14 días, siguiendo las instrucciones y recomendaciones de los kits utilizados. Para la diferenciación adipogénica, las células fueron cultivadas y diferenciadas con Poietics hMSC Adipogenic SingleQuots (Lonza; PT-4135). El procesamiento de resultados se realizó con la tinción de AdipoRed Assay Reagent (Lonza; PT-7009). Para la diferenciación osteogénica, las células fueron cultivadas y diferenciadas con Poietics hMSC Osteogenic SingleQuots (Lonza; PT-4120). El procesamiento de los resultados, se realizó con Osteomalge Mineralization Assay (Lonza; PA-1503). Cada tratamiento se realizó por triplicado y los resultados fueron analizados utilizando Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer Inc.; UK) y cuantificados con Harmony (PerkinElmer Inc.; UK).

## **10. Ensayos de Formación de Túbulos**

---

Los ensayos de formación de túbulos se realizaron con iPSC-MSCs, buscando evaluar un comportamiento 'del tipo endotelial' e indicador de un rearrreglo morfogénico adquirido ante el estímulo hormonal. Brevemente, 24 h previas a los experimentos, las placas de 96 pocillos a ser utilizadas fueron cubiertas con 40 µl de Geltrex [LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, (Gibco, Life Technologies)] y las células a utilizar fueron cultivadas en ausencia de SFB. Cada tratamiento se realizó por triplicado, sembrando 2x10<sup>4</sup> células / cm<sup>2</sup>. Las iPSC-MSCs fueron

incubadas con MC CUTLL1 previamente estimulado por THs en dilución 1:1 con el medio basal DMEM. A modo de control experimental, se utilizó SFB 10 % (control positivo) y medio basal DMEM (control negativo). Las placas así sembradas y estimuladas fueron incubadas durante 6 h, fijadas en PFA 4 % y fotografiadas (2 campos por pocillo). Los parámetros cuantificados fueron 'Lagunas' correspondiendo a distintas áreas cerradas formadas por la presencia de ramas y nódulos y 'Puntos de Brote', entendido como estructuras multicelulares que dan lugar a pequeños tubos que se extienden en forma radial hacia afuera.

## **11. Análisis Estadístico**

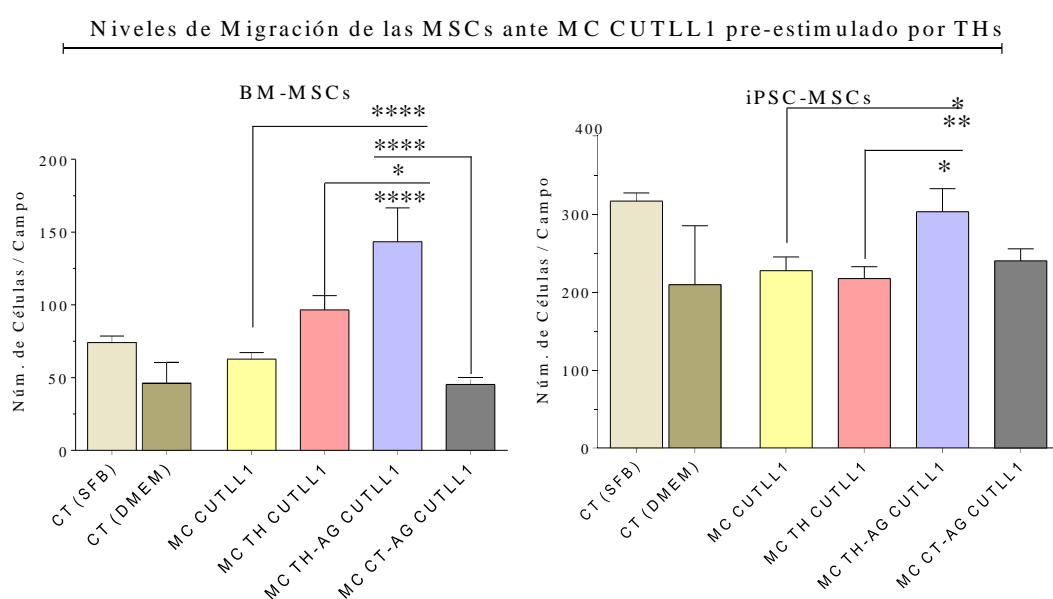
---

Los datos se expresaron como la media y su error estándar [media  $\pm$  SEM]. Se comprobó que los datos cumplieran con los principios de normalidad y homocedasticidad. El análisis estadístico se realizó utilizando análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones de más de 2 grupos experimentales y el Test de Student o Mann–Whitney para comparaciones de 2 grupos, según la distribución de los datos de valor. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . El software utilizado fue GraphPad Prism 6,01 (GraphPad Software, Inc).

## RESULTADOS

### Efectos del secretoma tumoral generado tras el estímulo de THs sobre las actividades asociadas al proceso migratorio en las MSCs

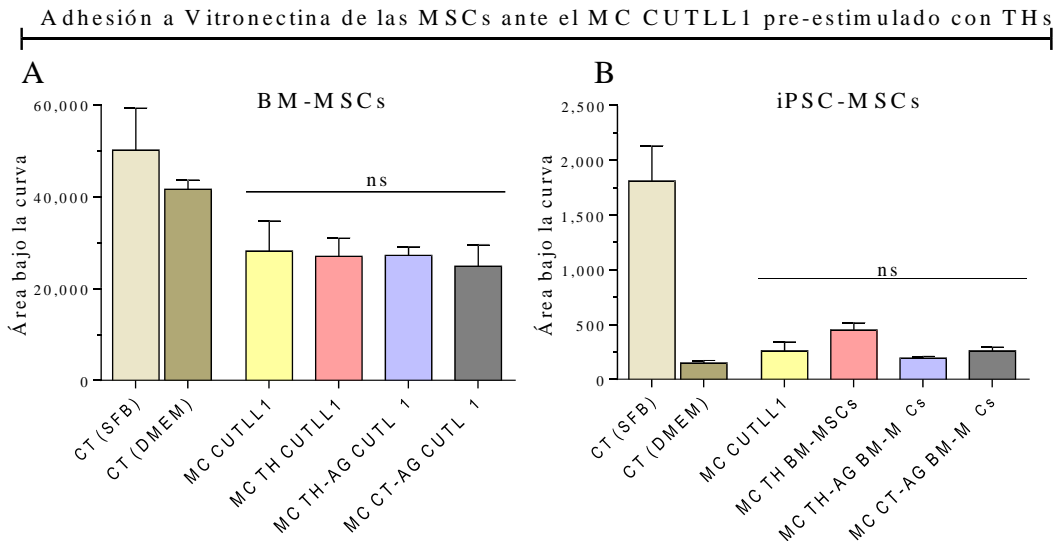
Las células CUTLL1 poseen receptores canónicos y no-canónicos para las THs, siendo susceptibles a su acción (Cayrol *et al.*, 2015), sin embargo, el efecto de su secretoma ante dicha modulación no ha sido previamente abordado. De esta forma se procedió a evaluar como el secretoma tumoral pre-estimulado por THs afecta aspectos relacionados con la capacidad migratoria de tanto las BM-MSCs como iPSC-MSCs. Se pudo observar, que las células tumorales, estimuladas vía Integrina  $\alpha\beta3$ , genera un secretoma que aumenta la motilidad de tanto las BM-MSCs, como de las iPSC-MSCs (Figura 2).



**Figura 2. Migración *in vitro* de las MSCs ante el secretoma tumoral pre-estimulado por THs.** Los gráficos representan el promedio de tres experimentos. Análisis estadístico, Anova de una vía-comparación múltiple de Tukey. [A] Migración de BM-MSCs, MC TH-AG CUTLL1 respecto al MC CUTLL1, MC CT-AG CUTLL1 y CT (DMEM) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ), y respecto al MC TH CUTLL1 (\* $p < 0,05$ ). [B] Migración de iPSC-MSCs, MC TH-AG CUTLL1 respecto al MC CUTLL1 y CT (DMEM) (\* $p < 0,05$ ), y respecto al MC TH CUTLL1 (\*\* $p < 0,01$ ). Controles, dado por CT (SFB) (positivo) y medio de cultivo basal sin estímulo quimiotáctico u hormonal, CT (DMEM) (negativo).

La adhesión celular es un importante factor asociado a los mecanismos involucrados durante la migración celular, aun más, la Vitronectina es uno de los ligandos de la Integrina  $\alpha\beta3$ , receptor no-canónico de las THs. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de adhesión a Vitronectina en las BM-MSCs e iPSC-MSCs en presencia del secretoma tumoral previamente modulado por THs. Se puede observar que el mismo no influye sobre la

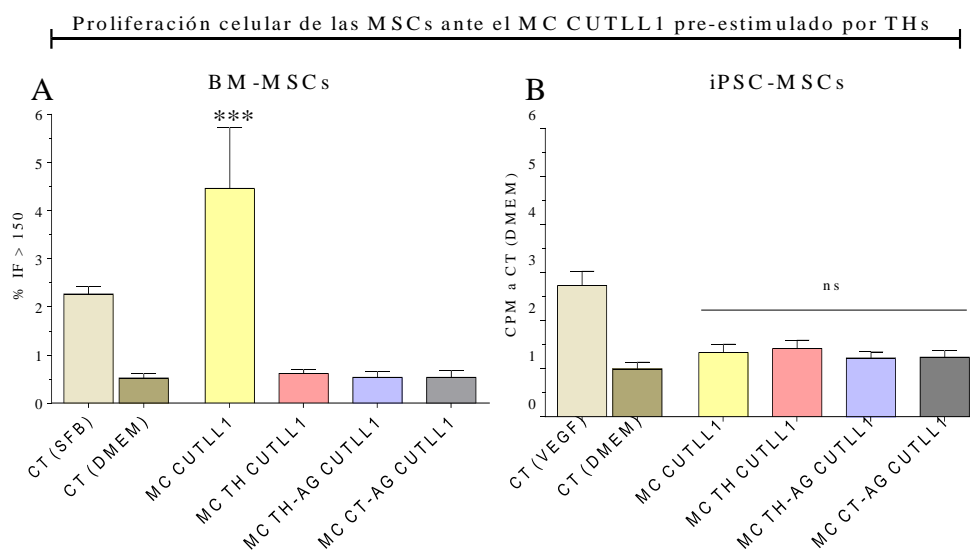
capacidad de adhesión (Figura 3). En ambos tipos celulares, no se observan diferencias significativas con respecto al control basal o con respecto al secretoma tumoral sin tratamiento con THs.



**Figura 3. Adhesión a Vitronectina de las MSCs en presencia del secretoma tumoral pre-estimulado por las THs.** Los gráficos representan el área bajo la curva del promedio de tres experimentos para [A], y dos experimentos para [B], realizados a tres tiempos (5, 15 y 30 min). Análisis estadístico, Anova de una vía-comparación múltiple de Tukey. [A] Adhesión de BM-MSCs, sin diferencias significativas. [B] Adhesión de iPSC-MSCs, sin diferencias significativas. Controles, dado por CT (SFB) (positivo) y medio de cultivo basal sin estímulo quimiotáctico u hormonal, CT (DMEM) (negativo).

### Efectos del secretoma tumoral generado tras el estímulo de THs sobre la proliferación de las MSCs

A continuación, se evaluaron los niveles proliferativos de las MSCs, generados por el secretoma tumoral pre-estimulado por THs. Las BM-MSCs muestran un aumento de la expresión del marcador Ki67 ante el secretoma tumoral generado en ausencia de THs (Figura 4.A). Por otro lado, las iPSC-MSCs no muestran incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, bajo las distintas condiciones (Figura 4.B).

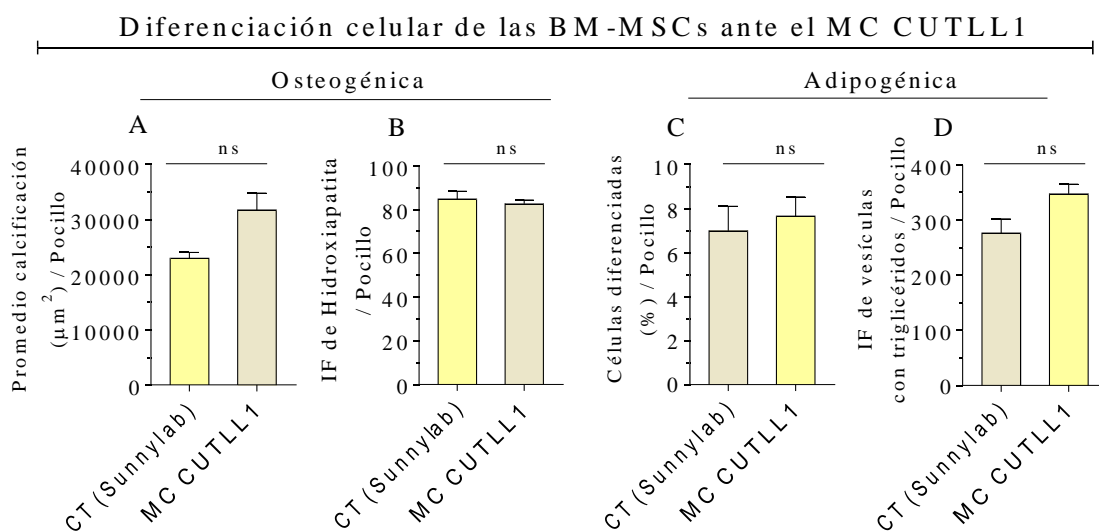


**Figura 4. Proliferación de las MSCs ante el secretoma tumoral pre-estimulado por THs.** Los gráficos representan el promedio de tres experimentos. Las células fueron estimuladas con secretoma tumoral (1:1).

Análisis estadístico, Anova de una vía-comparación múltiple de Tukey. [A] Porcentaje de intensidad de fluorescencia de Ki67 en las BM-MSCs, MC CUTLL1 respecto a CT (DMEM) (\*\*p<0,001). [B] Promedio de [<sup>3</sup>H]-timidina CPM de las iPSC-MSCs, sin diferencias significativas. Controles, dado por CT (SFB) / CT (VEGF) (positivo) y medio de cultivo basal CT (DMEM) (negativo).

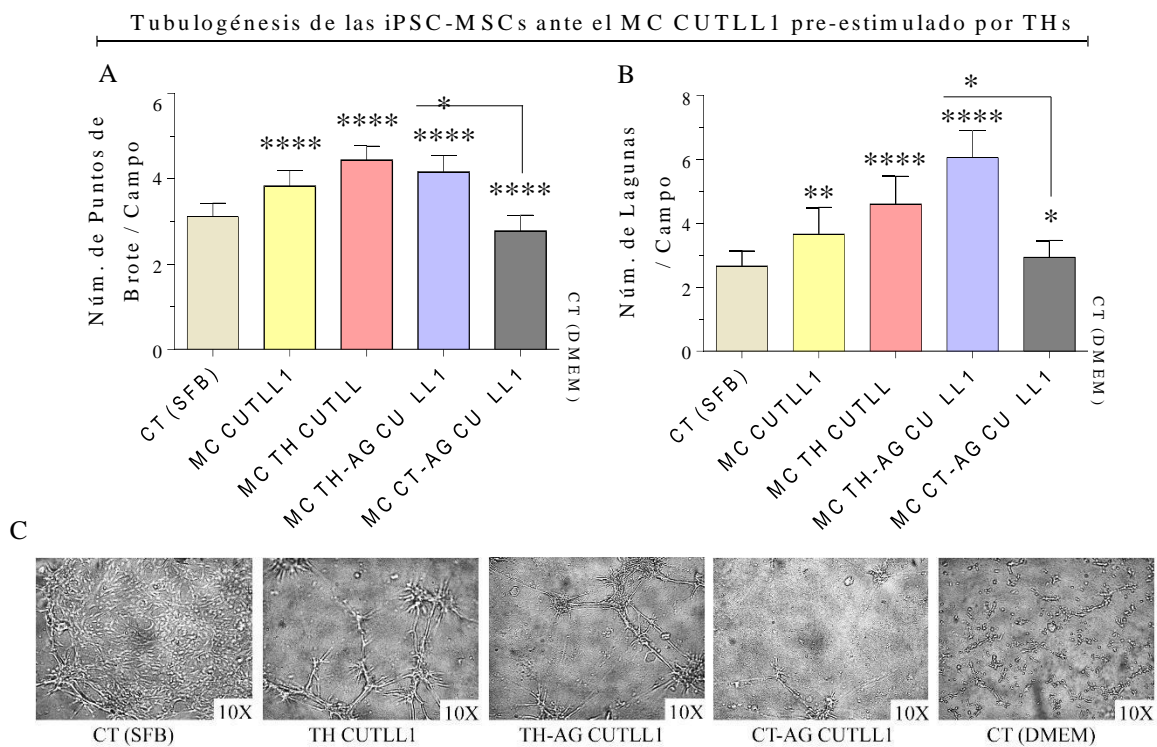
### Efectos del secretoma tumoral generado tras el estímulo de las THs sobre los niveles de diferenciación de las BM-MSCs y rearrreglos morfológicos en iPSC-MSCs

El arribo de MSCs a un microambiente inflamatorio y/o en remodelación y su compleja red de señalizaciones, puede inducir en ellas programas de compromiso o diferenciación celular. Por ello, se evaluaron los niveles de diferenciación de las BM-MSCs hacia los linajes adipogénico y osteogénico, en presencia del secretoma tumoral. Se observa que el secretoma no afecta los niveles de diferenciación celular con respecto al control, esto es, suero humano depletado de hormonas (Figura 5).



**Figura 25. Diferenciación osteogénica y adipogénica de las BM-MSCs ante el secretoma tumoral.** Los gráficos representan tres replicas en presencia de secretoma tumoral (1:1). Análisis estadístico, Anova de una vía-comparación múltiple de Tukey. [A] Promedio del área ( $\mu\text{m}^2$ ) calcificada por pocillo. [B] Intensidad de la señal fluorescente asociado a Hidroxiapatita por pocillo. [C] Promedio del porcentaje de células diferenciadas por pocillo. [D] Intensidad de la señal fluorescente asociada a vesículas intracelulares con contenido triglicérido por pocillo.

Por otro lado, también se evaluó la capacidad de las iPSC-MSCs, en presencia del secretoma tumoral pre-estimulado por THs, de adoptar rearrreglos morfológicos, atribuibles a un comportamiento del tipo-endotelial o como elementos celulares contribuyentes a procesos angiogénicos. Para ello, mediante ensayos de tubulogénesis, se cuantificó el número de puntos de brotes (Figura 6.A) y lagunas (Figura 6.B). Se puede observar que, indistintamente de la presencia o ausencia del tratamiento hormonal, el secretoma tumoral es capaz de inducir dichos rearrreglos morfológicos. Esta tendencia es consistente con otros parámetros cuantificados, incluyendo ramas y nódulos (datos no mostrados).



**Figura 26. Tubulogénesis de las iPSC-MSCs ante el secretoma tumoral pre-estimulado por THs.** Los gráficos representan el promedio de dos experimentos. Análisis estadístico, Anova de una vía-comparación múltiple de Tukey. [A] Número de puntos de brote por campo, tratamientos respecto a CT (DMEM) (línea base) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ), MC TH-AG CUTLL1 respecto a MC CT-AG CUTLL1 (\* $p < 0,05$ ). [B] Número de lagunas por campo, tratamientos respecto al CT (DMEM) (línea base) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ), MC TH-AG CUTLL1 respecto al MC CT-AG CUTLL1 (\* $p < 0,05$ ). [C] Fotografías representativas de los cultivos para cada tratamiento (10x). Controles, dado por CT (SFB) (positivo) y medio de cultivo basal, CT (DMEM) (negativo).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo abordó el estudio de la modulación ejercida por el secretoma tumoral, producido en presencia de THs, sobre las MSCs. Se utilizaron MSCs de dos fuentes, tanto de origen medular (BM-MSCs) como de cultivos pluripotentes, (iPSC-MSCs). Este último tipo celular se seleccionó como una alternativa de relevancia experimental y clínica para terapias celulares ‘paciente-específicas’ (Takahashi and Yamanaka, 2013). Previamente, demostrando que las células neoplásicas CUTLL1, estimuladas hormonalmente vía Integrina  $\alpha\beta3$ , aumentan su proliferación y la secreción de VEGF (Cayrol et al, 2015). Si bien las Integrinas, por sí mismas no son oncogénicas, su expresión es un factor contribuyente de la progresión tumoral y metástasis, regulando procesos que incluyen motilidad, adhesión, división celular y angiogénesis (Desgrosellier and Cheresh, 2010). Demostramos que las MSCs aumentan significativamente su migración al ser enfrentadas al secretoma tumoral producido por el estímulo de THs vía Integrina  $\alpha\beta3$ . Lo cual indica que no solo la Integrina  $\alpha\beta3$ , sería una molécula relevante por sí misma para la migración, sino también, que su estímulo genera un secretoma de mayor fuerza quimiotáctica. En parte, estos resultados podrían encontrarse vinculados al aumento de secreción de VEGF vía Integrina  $\alpha\beta3$  previamente mencionado (Cayrol et al, 2015), siendo un factor quimiotáctico reconocido para las MSCs (Ball, Shuttleworth and Kielty, 2007; Ishii *et al.*,

2019). Por otro lado, las iPSC-MSCs evidencian un incremento 2 veces mayor en sus niveles migratorios alcanzados, con respecto a las BM-MSCs. Este patrón, podría tratarse de una característica propia de las iPSC-MSCs. En relación, la adhesión celular en las MSCs es un mecanismo altamente relevante para el proceso migratorio (Wang and Chen, 2013). Por ello, se evaluó la capacidad adhesiva de las BM-MSCs e iPSC-MSCs frente a uno de los componentes de la MEC, la Vitronectina. Dicha molécula también es ligando de la Integrina  $\alpha\beta3$  (Cheresh and Felding-Habermann, 1993) y componente del estroma tumoral, particularmente en la región sub-endotelial, donde juega un rol importante en el comportamiento de las células tumorales y estromales allí presentes (Aaboe *et al.*, 2003; Pola, Formenti and Schneider, 2013). Mostramos que la modulación de THs por una u otra vía sobre las células tumorales produce un secretoma que no afecta la adhesión de las MSCs. Por otro lado, también se observa una diferencia en los niveles alcanzados de células adheridas entre los dos tipos de MSCs. Las BM-MSCs fueron capaces de adherirse 246 veces más que las iPSC-MSCs en condiciones basales.

En cuanto a la capacidad proliferativa, se muestra una disimilitud entre las BM-MSCs e iPSC-MSCs. Si bien ambas no respondieron positivamente frente al secretoma modulado por THs, las BM-MSCs sí muestran un aumento proliferativo ante el secretoma de las células tumorales en ausencia de hormonas. Resulta importante remarcar que los resultados obtenidos no son comparados entre sí, dado que se trata de técnicas distintas. Si bien se esperaba encontrar actividad asociada al secretoma rico en VEGF, molécula que también actúa como factor proliferativo de MSCs (Ball, Shuttleworth and Kielty, 2007), es posible que, al menos en los ensayos realizados sobre las iPSC-MSCs, exista un efecto de dilución del medio condicionado.

Finalmente, dado que la llegada de las MSCs a un microambiente tumoral puede inducir programas de compromiso / diferenciación celular, se evaluó en forma preliminar dicha habilidad en presencia del secretoma tumoral. El secretoma tumoral no modifica los niveles de diferenciación adipogénico y osteogénico de las BM-MSCs. Sin embargo un aumento en la réplica experimental y ensayos en presencia de las THs estimulando diferencialmente sus vías serán llevados a cabo con posterioridad. En cuanto a las iPSC-MSCs, las mismas mostraron rearrreglos morfogénicos asociados a la formación de túbulos, indistintamente de la presencia o ausencia del tratamiento hormonal. Análisis moleculares que complementen este estudio, como marcadores para Pericitos y otras células vasculares serían necesarios para acompañar la respuesta funcional observada. Estudios posteriores que abarquen la respuesta inmune, invasión, angiogénesis y diferenciación a fenotipos pro-tumorigénicos, por parte de las MSCs, ante el secretoma tumoral modulado diferencialmente por THs, resultaría un gran aporte.



## CONCLUSIONES

Dada la relevancia fisiológica de las MSCs sobre los procesos oncohematológicos, el rol clave de las THs en la homeostasis tisular, y contando con precedentes donde encontramos que las THs poseen un importante impacto en la leucomogénesis T, propusimos evaluar como el secretoma tumoral de T-ALL, modulado por THs, podrían impactar sobre la actividad de las MSCs. Las THs vía Integrina  $\alpha\beta3$  inducen un secretoma tumoral, capaz de aumentar la quimiotaxis de las MSCs. En relación, dicho secretoma reduce sus capacidades de adhesión, infiriendo un fenotipo con mayor tendencia a moverse. Interesantemente, solo las BM-MSCs mostraron proliferación ante el secretoma tumoral sin estímulo hormonal. Por otro lado, las iPSC-MSCs formaron estructuras tubulares asociadas a cierta capacidad angiogénica ante el secretoma tumoral.

## BIBLIOGRAFÍA

Aaboe, M. *et al.* (2003) 'Vitronectin in human breast carcinomas', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1638(1), pp. 72–82. doi: 10.1016/S0925-4439(03)00059-0.

Ades, E. *et al.* (1992) 'HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line.', *J Invest Dermatol.*, p. 683–690. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748.

Angulski, A. B. B. *et al.* (2017) 'The Protein Content of Extracellular Vesicles Derived from Expanded Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133+ and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Partially Explains Why both Sources are Advantageous for Regenerative Medicine', *Stem Cell Reviews and Reports*. Stem Cell Reviews and Reports, 13(2), pp. 244–257. doi: 10.1007/s12015-016-9715-z.

Ball, S. G., Shuttleworth, C. A. and Kielty, C. M. (2007) 'Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors', *The Journal of Cell Biology*, 177(3), pp. 489–500. doi: 10.1083/jcb.200608093.

Barreiro Arcos, M. L. *et al.* (2011) 'Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression', *Journal of Cellular Physiology*, 226(12), pp. 3208–3218. doi: 10.1002/jcp.22681.

Cayrol, F. *et al.* (2015) 'Integrin  $\alpha\text{v}\beta3$  acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells', *Blood*, 125(5), pp. 841–851. doi: 10.1182/blood-2014-07-587337.

Cheresh, D. A. and Felding-Habermann, B. (1993) 'Vitronectin and its receptors', *Cell Biology*, 5, pp. 864–868. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Felding-Habermann+and+Cheresh%2C+1993>.

Ishii, M. *et al.* (2019) 'Vascular endothelial growth factor-C promotes human mesenchymal stem cell migration via an ERK-and FAK-dependent mechanism', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer US, 455(1–2), pp. 185–193. doi: 10.1007/s11010-018-3481-y.

Luzzani, C. *et al.* (2015) 'A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement', *Stem Cell Research & Therapy*, 6(6), pp. 1–13. doi: 10.1186/scrt540.

Palomero, T. *et al.* (2006) 'CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to  $\gamma$ -secretase inhibitors', *Leukemia*, 20(7), pp. 1279–1287. doi: 10.1038/sj.leu.2404258.

Pola, C., Formenti, S. C. and Schneider, R. J. (2013) 'Vitronectin- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin engagement directs hypoxia-resistant mTOR activity and sustained protein synthesis linked to invasion by breast cancer cells', *Cancer Research*, 73(14), pp. 4571–4578. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0218.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2013) 'Induced pluripotent stem cells in medicine and biology', *Development*, 140(12), pp. 2457–2461. doi: 10.1242/dev.092551.

Wang, Y.-K. and Chen, C. S. (2013) 'Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(7), pp. 823–832. doi: 10.1111/jcmm.12061.

# IMPACTO DE LAS DISTINTAS TERAPIAS ACTUALES CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA RECUPERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y EN EL DESARROLLO DE INMUNIDAD FRENTE A FUTURAS EXPOSICIONES

Dra. María Noel Badano

Laboratorio de Patogenia de Infecciones Virales, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina

## RESUMEN

En el presente trabajo se han procesado muestras de 30 pacientes provenientes del Centro Integral de Gastroenterología, a partir de las cuales se aislaron los plasmas para la determinación de citoquinas. Del total de pacientes enrolados, el 77% había recibido previamente terapias basadas en interferón- $\alpha$  (IFN), siendo un 39% de ellos respondedores (R), mientras que un 13% no había recibido tratamiento previo (pacientes naïve). En base a al tratamiento recibido los pacientes fueron clasificados en tratados con IFN y en aquellos que posteriormente iniciaron tratamiento con las nuevas drogas antivirales de acción directa (DAAs).

Se determinaron los niveles plasmáticos de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21, TNF- $\alpha$  e IL-6 en los distintos grupos y se compararon con los niveles presentes en muestras de plasmas de donantes sanos (controles).

Observamos que en el conjunto de pacientes enrolados, los niveles plasmáticos de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21 estaban significativamente elevados respecto de los controles.

Con el fin de investigar el impacto de la terapia antiviral sobre la recuperación de la respuesta inmune, analizamos los niveles de citoquinas luego de la terapia con IFN y luego de la terapia con DAAs. Observamos que tanto los pacientes respondedores (R) como los no respondedores (NR) a IFN, presentaron niveles significativamente más altos de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21 con respecto a los controles. Por otra parte, los pacientes NR presentaron niveles significativamente elevados de IL-10 con respecto a los pacientes R. En cuanto a los pacientes con respuesta viral sostenida (RVS) luego de las drogas DAAs, observamos niveles basales de IL-10, IL-2 e IL-21 significativamente más altos con respecto a los controles. Por otra parte, luego de la terapia con DAAs, los niveles IL-10 permanecieron significativamente elevados con respecto a los controles.

Los resultados indican que tanto luego de la terapia con IFN como de la terapia con DAAs, las alteraciones en el microambiente de citoquinas plasmáticas originadas durante la infección crónica por HCV persisten. Los resultados sugieren además que el daño a la respuesta inmunológica causado durante la infección crónica podría ser irreversible.

Estudios adicionales que involucren individuos tratados durante la fase aguda, permitirán dilucidar si el daño producido en la respuesta inmune durante la infección por HCV, puede ser revertido cuando la terapia se inicia en la fase aguda.

## ABSTRACT

In this work, we processed samples from 30 patients who received medical care at the Integral Center of Gastroenterology, from which plasmas were isolated for cytokine assays. Of the total of enrolled patients, 77% had previously received interferon- $\alpha$ -based therapies (IFN), being about a 39% of them responders (R), while 13% had not received prior treatment (naïve patients). According to the treatment received, patients were classified as those treated with IFN therapies and those who subsequently started treatment with direct-acting antiviral drugs (DAAs).

Plasma levels of IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21, TNF- $\alpha$  and IL-6 were determined in the different groups and compared with the levels present in plasma samples from healthy donors (controls).

Significantly higher levels of IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21 were observed in the enrolled patients as compared to controls.

With the aim to investigate the impact of antiviral therapy on immune reconstitution, we analyzed cytokine levels after IFN and DAAs therapies. Both responding (R) and nonresponders (NR) patients to IFN displayed significantly higher levels of IL-10, TGF- $\beta$ ,

IL-2, IL-21 than controls. NR patients also displayed significantly higher values of IL-10 than R patients. Regarding patients with sustained viral response (SVR) after DAA drugs, we observed significantly higher baseline levels of IL-10, IL-2 and IL-21 as compared to controls. IL-10 levels remained significantly elevated after DAAs therapy compared to controls.

The results indicate that both after IFN and DAAs therapies, alterations in the plasmatic cytokine microenvironment caused during chronic HCV infection persist. The results also suggest that the damage to the immune response caused during chronic infection could be irreversible.

Additional studies in individuals treated during the acute phase of infection, could serve to elucidate whether the damage produced in the immune response during the course of HCV infection, could be reversed when therapy is initiated in the acute phase.

## **INTRODUCCIÓN**

Aproximadamente, entre un 75-85% de las personas infectadas por el virus de la hepatitis C (HCV) evoluciona cronicidad. A pesar de que la infección crónica por el HCV suele ser silenciosa, sin observarse síntomas por varios años, puede conducir a cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC) tras un periodo de evolución de 20 años (1). Conforme avanza la infección, ocurre un deterioro progresivo en la respuesta inmune celular específica para HCV, junto con alteraciones en el microambiente de citoquinas plasmáticas (2-7).

Con respecto a los tratamientos antivirales, previo al 2011 el tratamiento estándar para la hepatitis C se basaba en la terapia doble con interferón- $\alpha$  pegilado (IFNpeg) y ribavirina (RBV). Su limitada efectividad (50%) y toxicidad impulsaron el desarrollo de las nuevas drogas antivirales de acción directa (DAAs), que además de ofrecer una menor toxicidad y duración de la terapia, alcanzan tasas de efectividad superiores al 90% (8). Si bien hay numerosos estudios sobre la efectividad de las terapias antivirales, la información que se dispone acerca de una posible recuperación de la respuesta inmune luego de finalizadas las mismas, es incierta y discordante (6-18).

En el presente trabajo, analizamos el estado inmunológico de pacientes que fueron infectados por el HCV (HCV+). De los pacientes enrolados, la mayoría había recibido previamente terapias basadas en interferón- $\alpha$  (IFN), mientras que 12 pacientes recibieron a lo largo del estudio tratamiento con DAAs.

A través de la determinación de distintas citoquinas, analizamos la presencia de alteraciones en el microambiente de citoquinas plasmáticas, en una primera instancia, en el conjunto de pacientes enrolados, y posteriormente, agrupando a los pacientes de acuerdo al esquema terapéutico recibido, considerando la respuesta al mismo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Pacientes***

Se procesaron las muestras de 30 pacientes provenientes del Centro Integral de Gastroenterología, y de 20 donantes sanos (grupo control) provenientes de bancos de sangre, a partir de las cuales se aislaron los plasmas para la determinación de citoquinas. Del total de pacientes enrolados, 23 habían recibido previamente terapias basadas en IFN, siendo 9 de ellos respondedores (R), mientras que 4 de los pacientes no había recibido tratamiento previo (pacientes naïve). 12 pacientes iniciaron durante el transcurso del estudio terapias con DAAs, observándose una respuesta viral sostenida (RVS) en el 91% de ellos. En base a al tratamiento recibido los pacientes fueron clasificados en tratados con IFN y en aquellos que posteriormente iniciaron tratamiento con DAAs.

### ***Estadificación de la enfermedad hepática***

Los estadios de fibrosis hepática fueron determinados mediante biopsia hepática o elastografía de transición (FibroScan): F0: ausencia de fibrosis, F1: fibrosis leve, F2: fibrosis moderada, F3: fibrosis grave, F4: fibrosis severa (cirrosis). El avance de la enfermedad hepática fue evaluado además mediante los índices serológicos APRI, FORNS y FIB-4, que fueron calculados de acuerdo a las siguientes fórmulas y utilizados con los valores de corte recomendados en la bibliografía (5):

-APRI:  $AST/AST_{ref} \times 100 / \text{Plaquetas}$ . Un valor  $\leq 0.5$  indica ausencia de fibrosis significativa,  $> 1.5$  presencia de fibrosis significativa y  $> 2$  presencia de cirrosis.

-FORNS:  $7.811 - 3.131 \times \ln(\text{Plaquetas}) + 0.781 \times \ln(\gamma\text{-GT}) + 3.467 \times \ln(\text{Edad}) - 0.014 \times \text{Colesterol}$ . Un valor  $<4.2$  indica ausencia de fibrosis significativa y  $>6.9$  presencia de fibrosis significativa.  
-FIB-4:  $\text{Edad} \times \text{AST}/\text{Plaquetas} \times \sqrt{\text{ALT}}$ : Un valor  $<1.45$  indica ausencia de fibrosis avanzada y  $>3.25$  presencia de fibrosis avanzada.

### ***Datos de laboratorio***

A partir de las consultas con los médicos tratantes y de las historias clínicas, se obtuvo la información relacionada al estado clínico y a la progresión de la enfermedad hepática de los pacientes. Se recolectaron los datos relacionados a la carga viral y el genotipo del HCV, fecha de nacimiento, sexo, coinfección con HIV. Se anotaron los niveles de las enzimas hepáticas aspartatoaminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT), gammaglutamiltranspeptidasa ( $\gamma$ GT), colesterol total y recuentos de plaquetas para el cálculo de los índices serológicos APRI, FORNS y FIB-4. En cuanto a los tratamientos antivirales, se registrarán los esquemas, las fechas de inicio y finalización, y la respuesta a los mismos.

### ***Determinación de citoquinas***

El plasma aislado a partir de sangre anticoagulada con EDTA fue conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las concentraciones plasmáticas de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21, TNF- $\alpha$  e IL-6 fueron determinadas por ELISA mediante el uso de kits comerciales. Los límites de detección de los kits fueron 2 pg/ml para IL-10 e IL-6, 62 pg/ml para TGF- $\beta$  y 4 pg/ml para IL-2 y TNF- $\alpha$ .

### ***Análisis estadísticos***

Se realizó una prueba t no pareada o la prueba de Mann-Whitney para analizar diferencias entre dos grupos o entre etapas previas y posteriores al tratamiento antiviral. Las variables cualitativas se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. En todos los casos, un valor de  $p < 0.05$  se consideró indicativo de una diferencia significativa. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

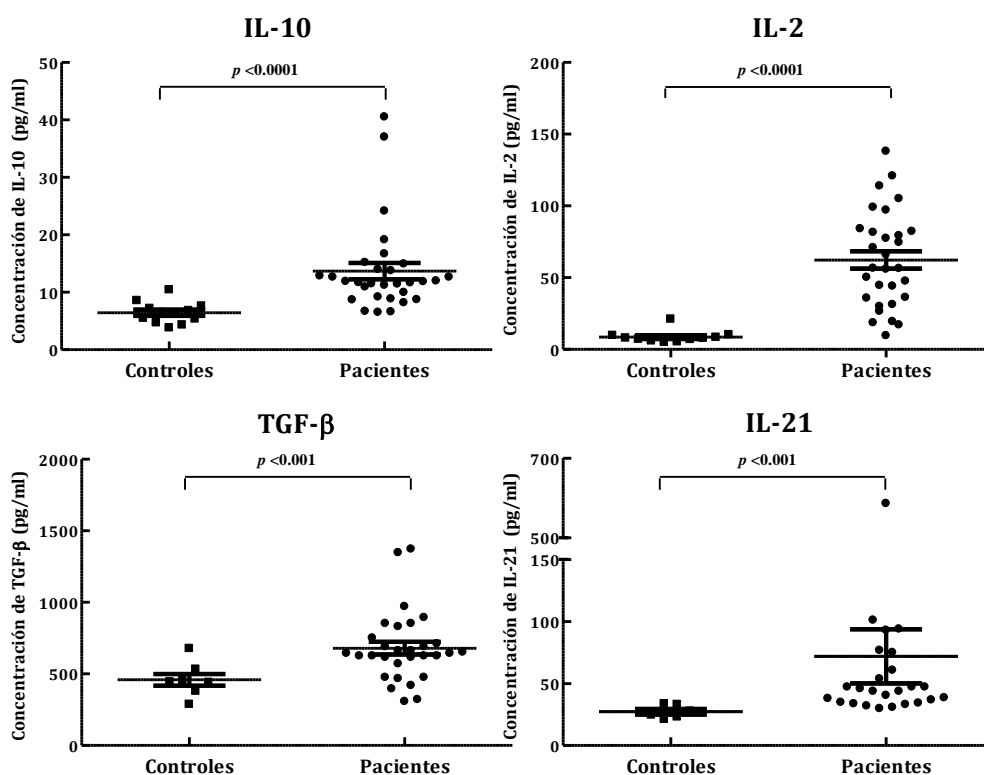
## **RESULTADOS**

La Tabla 1 indica las características principales de los pacientes incluidos en el estudio. Del total de pacientes enrolados en el estudio ( $n=30$ ), el 73% eran hombres, el 54% fue infectado por el genotipo 1b del HCV y un 50% se encontraba en estadio de fibrosis avanzadas (F3-F4). Con respecto a los tratamientos antivirales, el 13% de los pacientes no había recibido tratamientos previos (pacientes naïve), el 77% había recibido previamente terapias basadas en interferón- $\alpha$  (IFN), siendo un 39% de ellos respondedores (R), mientras que 12 pacientes iniciaron durante el transcurso del estudio terapias con DAAs, observándose una respuesta viral sostenida (RVS) en el 91% de ellos.

Variable	n o mediana (rango)
Número de Pacientes	30
Edad	61 (30-75)
Sexo (Femenino/Masculino)	8/22
Genotipo HCV (1a/1b/2a/2a2c/3a)	4/14/1/4/3
CV HCV (IU/mL)	142.124 (<10-9.990.000)
Estadio de Fibrosis (F0-F2/F3-F4)	10/10
APRI	0.5 (0.1-5.5)
FORNS	6.3 (2.5-11.84)
FIB-4	1.95 (0.62-10.93)
AST (UI/L)	31 (13-156)
ALT (UI/L)	45 (14-236)
GGT (UI/L)	50 (17-167)
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	186.000 (50.000-331.000)
Colesterol	153 (119-221)
Tratamiento previo con IFN	23
R/NR	9/14
Tratamiento con DAAs	12
R/NR	10/1
Coinfección HIV	2

**Tabla 1. Características de los pacientes enrolados en el estudio.** CV: carga viral, F0-F4: estadios de fibrosis hepática determinados mediante biopsia hepática o FibroScan: F0: ausencia de fibrosis, F1: fibrosis leve, F2: fibrosis moderada, F3: fibrosis grave, F4: fibrosis severa (cirrosis), AST: aspartatoaminotransferasa, ALT: alaninoaminotransferasa, GGT: gammaglutamiltranspeptidasa, R: respondedores a la terapia, NR: no respondedores a la terapia.

En primaria instancia, determinamos los valores de citoquinas en los pacientes enrolados. Observamos que los niveles plasmáticos de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2 e IL-21, fueron significativamente más altos en los pacientes con respecto a los controles (Figura 1 y Tabla 2). No observamos diferencias significativas en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 entre ambos grupos.



**Figura 1. Niveles de citoquinas en los pacientes enrolados en el estudio.** Mediante ELISA se midió la concentración de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2, IL-21, TNF- $\alpha$  e IL-6 en muestras de plasma de los pacientes. Se utilizaron como controles plasmas de donantes sanos de bancos de sangre (N=13). Los valores están expresados como medianas (rango).

Citoquina	Controles (n=13)	Pacientes (n=30)	p
IL-10 (pg/ml)	6.46 (3.83-10.43)	11.77 (6.53-40.54)	<0.0001
TGF-β (pg/ml)	442 (288-677)	644 (307-1373)	0.0076
IL-2 (pg/ml)	7.71 (4.91-21.01)	56.53 (9.62-138.10)	<0.0001
IL-21 (pg/ml)	26.09 (21.23-33.73)	43.77 (29.77-586.1)	0.0009
TNF-α (pg/ml)	3.20 (2.16-3.88)	3.35 (2.11-39.73)	0.34
IL-6 (pg/ml)	4.76 (2.98-6.53)	3.08 (1.83-43.15)	0.085

**Tabla 2. Niveles de citoquinas plasmáticas en pacientes enrolados en el estudio.** Mediante ELISA se midió la concentración de IL-10, TGF-β, IL-2, IL-21, TNF-α e IL-6 en muestras de plasma de los pacientes. Se utilizaron como controles plasmas de donantes sanos de bancos de sangre (N=13). Los valores están expresados como medianas (rango).

A continuación realizamos un análisis por separado de acuerdo al esquema de terapia recibido.

### **Pacientes tratados con IFN**

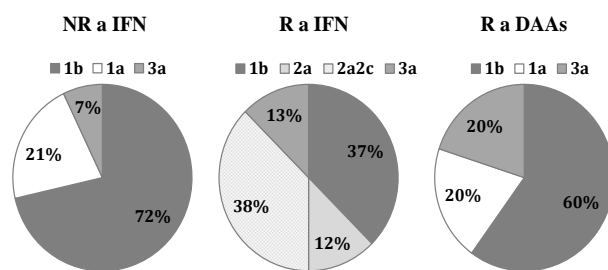
Analizamos las características de los pacientes que habían recibido previamente terapias basadas en IFN. Observamos una diferencia significativa ( $p=0.01$ ) en la distribución de genotipos entre los pacientes R y NR a IFN (Figura 2). Mientras que en el grupo de pacientes NR prevaleció el genotipo 1b, seguido por el genotipo 1a, en el grupo de pacientes R se observó un predominio del genotipo 2a (junto al 2c o sólo) y ausencia del genotipo 1a. Estos resultados concuerdan con resultados publicados previamente en los cuales se observa mayores tasas de RVS en pacientes que presentaban genotipos de HCV distintos al 1. Por otra parte, 2 de los pacientes NR presentaban coinfección con HIV, estando bajo terapia antirretroviral. No observamos diferencias entre los dos grupos con respecto a la edad o distribución del género (Tabla 3).

Mediante el cálculo de los índices serológicos APRI, FORNS y FIB-4, evaluamos el avance de la enfermedad hepática (5). Observamos que los pacientes NR presentaron índices serológicos más altos con respecto a los pacientes R, observándose una diferencia significativa en los niveles de APRI y FIB-4 (Tabla 3).

En cuanto a los niveles de citoquinas plasmáticas, tanto los pacientes R como los NR a IFN presentaron niveles significativamente más altos de IL-10, TGF-β, IL-2 e IL-21 con respecto a los controles. Por otra parte, los pacientes NR a IFN presentaron mayores niveles de IL-10 e IL-2 con respecto a los pacientes R, observándose una diferencia significativa en los niveles de IL-10 (Tabla 3).

Variable	Controles (n=13)	R (n=9)	NR (n=14)
Edad	NA	67 (52-75)	60 (42-72)
Sexo Femenino/Masculino (n)	NA	1/8	4/10
Coinfección HIV +/- (n)	NA	0/9	2/12
APRI	NA	0.3 (0.1-0.4)	0.9 (0.3-5.5) <sup>a</sup>
FORNS	NA	5.9 (4.2-8.6)	6.7 (5.1-11.8)
FIB-4	NA	1.39 (0.62-2.21)	2.52 (0.94-10.93) <sup>b</sup>
IL-10 (pg/ml)	6.46 (3.83-10.43)	8.68 (6.53-16.69) <sup>e</sup>	12.64 (8.75-24.13) <sup>cf</sup>
TGF-β (pg/ml)	442 (288-677)	653 (571-970) <sup>d</sup>	663 (307-1348) <sup>f</sup>
IL-2 (pg/ml)	7.71 (4.91-21.01)	47.57 (29.94-120.90) <sup>d</sup>	81.61 (9.62-138.10) <sup>c</sup>
IL-21 (pg/ml)	26.09 (21.23-33.73)	45.48 (30.88-93.87) <sup>e</sup>	39.22 (29.77-586.1) <sup>e</sup>
TNF-α (pg/ml)	3.20 (2.16-3.88)	3.80 (2.88-4.63)	3.11 (2.11-8.37)
IL-6 (pg/ml)	4.76 (2.98-6.53)	2.82 (2.09-5.11)	3.08 (1.83-43.15)

**Tabla 3. Características de los pacientes que habían recibido previamente terapias basadas en IFN.** R: respondedores a la terapia, NR: no respondedores a la terapia, NA: no aplica. Mediante ELISA se midió la concentración de IL-10, TGF-β, IL-2, IL-21, TNF-α e IL-6 en muestras de plasma de pacientes R y NR a IFN. Se utilizaron como controles plasmas de donantes sanos de bancos de sangre (N=13). Los valores están expresados como medianas (rango). <sup>a</sup> $p < 0.001$  comparado con R, <sup>b</sup> $p < 0.01$  comparado con R, <sup>c</sup> $p < 0.0001$  comparado con controles, <sup>d</sup> $p < 0.001$  comparado con controles, <sup>e</sup> $p < 0.01$  comparado con controles, <sup>f</sup> $p < 0.05$  comparado con controles ó R.



**Figura 2. Distribución de genotipos en los pacientes según la terapia recibida y la respuesta a la misma.** R: respondedores a la terapia, NR: no respondedores a la terapia, IFN: IFN interferón- $\alpha$ , DAAs: drogas antivirales de acción directa.

### *Pacientes tratados con DAAs*

La Tabla 4 indica las características basales de aquellos pacientes que iniciaron terapias con DAAs durante el transcurso del estudio.

Pte	Tratamiento	RVS	Gt	Edad	Sexo	Fibrosis	APRI	FORNS	FIB-4	Terapia previa IFN	HIV+
4	DCV/SOF	Si	1a	56	M	F2-F3	1.1	7.0	2.45	Si	No
8	DSV/OBV/PTV/r	Si	1b	60	F	F2	1.3	6.5	2.52	Si	No
9	DCV/ASV	Si	1b	62	M	F4	1.3	7.6	3.31	Si	No
10	SOF/LDV/RBV	Si	1a	57	M	F4	5.5	10.1	10.93	Si	No
13	SOF/LDV	Si	1b	62	F	F4	0.9	11.8	3.14	Si	No
16	SOF/DCV/RBV	Si	1b	72	M	F3-F4	0.3	5.8	1.32	Si	No
17	SOF/DCV/RBV	Si	3a	58	F	F3-F4	4.6	9.9	8.01	No	No
19	SOF/DCV/RBV	Si	1b	67	M	F3-F4	2.2	5.7	3.71	Si	No
22	SOF/LDV	-	1b	63	F	F1	0.6	6.7	1.96	Si	No
24	DSV/OBV/PTV/r	No	1b	54	M	F1-F2	0.9	6.0	2.34	Si	Si
25	DCV/SOF	Si	1b	42	M	F4	4.7	10.6	7.75	Si	No
28	SOF/DCV/RBV	Si	3a	60	M	F4	2.3	9.6	5.39	Si	No

**Tabla 4. Características basales de los pacientes que iniciaron terapias con DAAs.** Pte: paciente, RVS: respuesta viral sostenida, Gt: genotipo, HIV+: coinfección con HIV, DCV: Daclastavir, SOF: sofosbuvir, DSV: dasabuvir, OBV: ombitasvir, PTV: paritaprevir, r: ritonavir, ASV: asunaprevir, LDV: ledipasvir; RBV: ribavirina.

Como puede observarse, el 67% de los pacientes estaba infectado por el genotipo 1b del HCV y eran hombres, con una mediana de 60 años de edad. Con respecto al avance de la enfermedad hepática, el 75 % presentaba estadios de fibrosis avanzados (F3-F4), observándose una mediana de 1.3 de APRI, de 7.3 de FORNS y de 3.23 de FIB-4. En cuanto a la efectividad de la terapia, el 91% de los pacientes presentó una RVS. A diferencia de la terapia con IFN, la mayoría de los pacientes con RVS luego de las drogas DAAs habían sido infectados por el genotipo 1b (Figura 2). Varios reportes indican una menor tasa de respuesta a las DAAs en pacientes con genotipo 1a y 3, cirrosis y NR a IFN. En el presente estudio el único paciente NR a DAAs presentaba genotipo 1b, estadio de fibrosis F1-F2, fallo al tratamiento previo con IFN y coinfección con HIV.

Con respecto a los niveles de citoquinas, no observamos diferencias significativas entre los niveles basales de TGF- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  de los pacientes con RVS y los controles. Por otro lado, los niveles basales de IL-10, IL-2 e IL-21, fueron significativamente más altos en los pacientes con RVS con respecto a los controles (Tabla 5).

Con el objeto de evaluar el impacto de la terapia antiviral con DAAs sobre la recuperación de la respuesta inmune, comparamos los niveles basales de distintas citoquinas con respecto a los presentes luego del tratamiento en pacientes con RVS. No observamos diferencias significativas en los niveles de TGF- $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$  entre ambas instancias, permaneciendo significativamente elevados los niveles de IL-10 luego de la terapia con respecto a los controles (Tabla 5).



Citoquina	Controles (n=13)	RVS pre-DAAs (n=9)	RVS post-DAAs (n=8)
IL-10 (pg/ml)	6.46 (3.83-10.43)	12.64 (9.19-24.13) <sup>a</sup>	12.42 (7.76-31.73) <sup>b</sup>
TGF-β (pg/ml)	442 (288-677)	625 (307-852)	716 (396-1901)
IL-2 (pg/ml)	7.71 (4.91-21.01)	70.87 (9.62-138.10) <sup>b</sup>	–
IL-21 (pg/ml)	26.09 (21.23-33.73)	38.58 (29.77-586.1) <sup>c</sup>	–
TNF-α (pg/ml)	3.20 (2.16-3.88)	3.11 (2.11-39.73)	3.48 (2.61-6.68)
IL-6 (pg/ml)	4.76 (2.98-6.53)	4.19 (1.93-43.15)	3.18 (2.53-5.20)

**Tabla 5. Niveles de citoquinas plasmáticas en pacientes con RVS luego del tratamiento con DAAs.** Se indican los valores basales (pre-DAAs) y posteriores (post-DAAs) al tratamiento. Mediante ELISA se midió la concentración de IL-10, TGF-β, IL-2, IL-21, TNF-α e IL-6 en muestras de plasma de los pacientes. Se utilizaron como controles plasmas de donantes sanos de bancos de sangre (N=13). Los valores están expresados como medianas (rango).

<sup>a</sup> $p < 0.0001$  comparado con controles, <sup>b</sup> $p < 0.001$  comparado con controles, <sup>c</sup> $p < 0.01$  comparado con controles.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, investigamos el estado inmunológico de pacientes que fueron infectados por HCV. Mediante la determinación de distintas citoquinas, analizamos la presencia de alteraciones en el microambiente de citoquinas plasmáticas.

Observamos que en el conjunto de pacientes enrolados, los niveles plasmáticos de IL-10, TGF-β, IL-2 e IL-21 estaban significativamente elevados respecto de los controles.

Con el fin de investigar el impacto de la terapia antiviral sobre la recuperación de la respuesta inmune, analizamos los niveles de citoquinas luego de la terapia con IFN y luego de la terapia con DAAs. Observamos que tanto los pacientes R como los no NR a IFN, presentaron niveles significativamente más altos de IL-10, TGF-β, IL-2 e IL-21 con respecto a los controles. Por otra parte, los pacientes NR a IFN presentaron mayores niveles de IL-10 e IL-2 con respecto a los pacientes R, observándose una diferencia significativa en los niveles de IL-10.

En cuanto a los pacientes con RVS luego de las drogas DAAs, observamos niveles basales de IL-10, IL-2 e IL-21 significativamente más altos con respecto a los controles. Por otra parte, luego de la terapia con DAAs, los niveles IL-10 permanecieron significativamente elevados con respecto a los controles.

Estudios previos sobre la restauración del microambiente de citoquinas plasmáticas luego del clearance del HCV inducido por la terapia, arrojan resultados discordantes, algunos indicando la restauración del microambiente de citoquinas (7), mientras que otros reportan que no se produciría una completa reconstitución del microambiente de citoquinas plasmáticas luego de la terapia con DAAs (6).

En el presente trabajo, hemos observado que luego de la terapia con IFN y luego de la terapia con DAAs, persisten alteraciones en el microambiente de citoquinas plasmáticas.

En el caso de la terapia con IFN, los pacientes R presentaron menores niveles de IL-10 e IL-2 con respecto a los pacientes NR, sin embargo no logran la normalización de los mismos. Por lo que la terapia con IFN parecería tener un impacto sobre los niveles de citoquinas, pero no sería suficiente para revertir los niveles a valores normales. Por otra parte, los pacientes NR presentaron índices serológicos más altos con respecto a los pacientes R. Por lo tanto, la presencia de infección crónica por HCV y/o enfermedad hepática avanzada, podrían explicar los mayores niveles de citoquinas en el grupo NR con respecto al R.

Los resultados indican que las alteraciones en el microambiente de citoquinas plasmáticas originadas durante la infección crónica por HCV, permanecen aun cuando el antígeno ya no esté más presente como resultado de la terapia antiviral, sugiriendo que el daño a la respuesta inmunológica causado durante la infección crónica sería irreversible.

Se ha reportado que el tratamiento con IFN durante la fase aguda, permitiría un mejor restablecimiento de la respuesta inmune con respecto al tratamiento con IFN durante la etapa crónica (9). En el caso de las terapias con DAAs, aún no se dispone de información sobre la posibilidad de recuperación de la respuesta inmune cuando el tratamiento se inicia en la fase aguda.

Estudios futuros sobre la posibilidad de recuperación de la respuesta inmune en individuos tratados durante la fase aguda, permitirán dilucidar si el daño producido en la respuesta inmune durante la infección por HCV, puede ser revertido cuando la terapia se inicia en la fase aguda.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Freeman AJ et al. Estimating Progression to Cirrhosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 809-816.
- 2) Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011; 12: 492-499.
- 3) Golden-Mason L et al. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol*. 2007; 81: 9249-9258.
- 4) Golden-Mason L et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*. 2009; 83: 9122-9130. doi: 10.1128/JVI.00639-09.
- 5) Badano MN et al. Influence of Hepatitis C virus coinfection on immune reconstitution in HIV subjects. *Med Microbiol Immunol*. 2019. doi: 10.1007/s00430-019-00619-4.
- 6) Hengst J et al. Direct-Acting Antiviral-Induced Hepatitis C Virus Clearance Does Not Completely Restore the Altered Cytokine and Chemokine Milieu in Patients With Chronic Hepatitis C. *J Infect Dis*. 2016; 214: 1965-1974.
- 7) Saraiva GN et al. Restoring Inflammatory Mediator Balance after Sofosbuvir-Induced Viral Clearance in Patients with Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm*. 2018; 2018: 8578051. doi: 10.1155/2018/8578051.
- 8) Ahlén G et al. Containing "The Great Houdini" of viruses: combining direct acting antivirals with the host immune response for the treatment of chronic hepatitis C. *Drug Resist Updat*. 2013; 16: 60-67.
- 9) Badr G et al. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells. *J Virol*. 2008; 82: 10017-10031. doi: 10.1128/JVI.01083-08.
- 10) Abdel-Hakeem MS et al. Comparison of immune restoration in early versus late alpha interferon therapy against hepatitis C virus. *J Virol*. 2010; 84: 10429-10435. doi: 10.1128/JVI.01094-10.
- 11) Grady BP et al. Hepatitis C virus reinfection following treatment among people who use drugs. *Clin Infect Dis*. 2013; 57: S105-110. doi: 10.1093/cid/cit301.
- 12) Martin B et al. Restoration of HCV-specific CD8+ T cell function by interferon-free therapy. *J Hepatol*. 2014; 61: 538-543. doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.043.
- 13) Shrivastava S et al. Augmentation of hepatitis C virus-specific immunity and sustained virologic response. *J Viral Hepat*. 2017; 24: 742-749. doi: 10.1111/jvh.12702.
- 14) Shrivastava S et al. Multitarget Direct-Acting Antiviral Therapy Is Associated With Superior Immunologic Recovery in Patients Coinfected With Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Hepatology*. 2018; 2: 1451-1466. doi: 10.1002/hep4.1258.
- 15) Wieland D et al. TCF1+ hepatitis C virus-specific CD8+ T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nat Commun*. 2017; 8:15050. doi: 10.1038/ncomms15050.
- 16) Zhang C et al. Comprehensive mapping of antigen specific T cell responses in hepatitis C virus infected patients with or without spontaneous viral clearance. *PLoS One*. 2017; 12:e0171217. doi: 10.1371/journal.pone.0171217.
- 17) Aregay A et al. Elimination of hepatitis C virus has limited impact on the functional and mitochondrial impairment of HCV-specific CD8+ T cell responses. *J Hepatol*. 2019; 71: 889-899. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.025.
- 18) Sulkowski MS et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med*. 2014; 370: 211-221. doi: 10.1056/NEJMoa1306218.

# EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD16, CD163 Y MerTK COMO BIOMARCADORES DE LA TUBERCULOSIS

Luciana Balboa

Instituto de Medicina Experimental IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

## Resumen

*Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno humano altamente virulento que infecta aproximadamente a un tercio de la población mundial. Actualmente la evaluación clínica y la radiografía de tórax son las herramientas más usadas para la evaluación de los pacientes con tuberculosis, mientras que las baciloscopias y la conversión del cultivo de esputo a los dos meses son los marcadores para evaluar la carga bacteriana y la efectividad del tratamiento. Sin embargo, es necesario evaluar biomarcadores más robustos para mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento de la tuberculosis.

Previamente demostramos que la infección pulmonar con *M. tuberculosis* es capaz de impactar a nivel sistémico en los monocitos circulantes alterando la distribución de las subpoblaciones existentes y presentando una predisposición a generar macrófagos (células CD14<sup>POS</sup>) con función inmunosupresora. Entre las moléculas que están incrementadas en dichos macrófagos se encontraron: CD16, CD163 y MerTK. Estas moléculas han sido asociadas a un estado anti-inflamatorio de los macrófagos humanos. En base a estos antecedentes nos propusimos evaluar la abundancia de CD163 y MerTK en monocitos circulantes y sus formas solubles plasmáticas como posibles biomarcadores de la tuberculosis.

En primera instancia observamos un incremento en la expresión de CD16, MerTK y CD163 en células CD14<sup>POS</sup> presentes en el líquido pleural de pacientes con tuberculosis en comparación con la expresión hallada en monocitos de sangre periférica o en células CD14<sup>POS</sup> presentes en líquidos pleurales asociados a otra etiología. Estos resultados demuestran que los macrófagos presentes en el sitio de infección (compartimento pleural) presentan un fenotipo inmunosupresor al menos en términos de la expresión de CD16, MerTK y CD163. No encontramos diferencias en la expresión de CD163 o MerTK en los monocitos circulantes de los pacientes con tuberculosis respecto de los monocitos de individuos sanos. Teniendo en cuenta que estos receptores pueden ser clivados en circulación decidimos determinar la abundancia plasmática de las formas solubles de CD163 y MerTK (sCD163 y sMerTK respectivamente). De forma muy interesante, encontramos que el contenido de las moléculas sCD163 y sMerTK está incrementado en el plasma de pacientes con tuberculosis respecto del plasma de individuos sanos. Adicionalmente, dichos parámetros se asociaron positivamente con la severidad de los hallazgos radiológicos y con la respuesta frente al tratamiento antituberculoso. Finalmente comparamos el valor diagnóstico del contenido de sCD163 y sMerTK mediante el método estadístico curva ROC, y demostramos que la abundancia de la molécula sCD163 tiene un mejor desempeño como biomarcador de la tuberculosis respecto de sMerTK. Consideramos que la evaluación de la abundancia de sCD163 plasmática en combinación con otros parámetros podría impactar en la práctica clínica modificando el tiempo y/o esquema de tratamiento, así como también en estudios clínicos al permitir evaluar rápidamente la respuesta al tratamiento con nuevos fármacos y/o la eficacia de nuevas vacunas.

## Informe Final

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un patógeno humano altamente virulento que infecta aproximadamente a un tercio de la población mundial. En 2016, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis (TB) y 1,3 millones murieron entre las personas sin VIH [1]. Según el test cutáneo de la tuberculina, se calcula que un tercio de la población mundial tiene una infección tuberculosa latente (TBL), no existiendo manifestaciones clínicas, bacteriológicas ni radiológicas que evidencien la infección (2). Durante este estadio, Mtb tiene presente metabolismo bajo y expresa antígenos diferentes a los que expresa durante la tuberculosis activa (enfermedad). La mayoría de los fármacos antituberculosos, incluyendo la isoniazida (comúnmente usada quimioprofilaxis de la TBL), han sido evaluados experimentalmente en condiciones donde el Mtb tiene un metabolismo alto, esto es, durante la replicación bacilar. Incluso en países con baja incidencia de TB, la dificultad en el diagnóstico inicial incrementa la proporción de TB en estadios avanzados (3). Si bien los esquemas de tratamiento han sido exitosos, todavía existen algunas limitaciones: 1) la duración del esquema terapéutico (6 meses) contribuye a la no adherencia al tratamiento y lleva a incrementar los fallos del tratamiento y las recaídas de la enfermedad; 2) la resistencia a los fármacos con el empleo de drogas de segunda línea y graves efectos adversos; 3) la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana; y 4) la quimioprofilaxis en TBL (4). De hecho en nuestro país en 2016 se registraron 10.506 nuevos casos y recaídas por TB, con una incidencia de 25 casos nuevos por 100.000 habitantes (1).

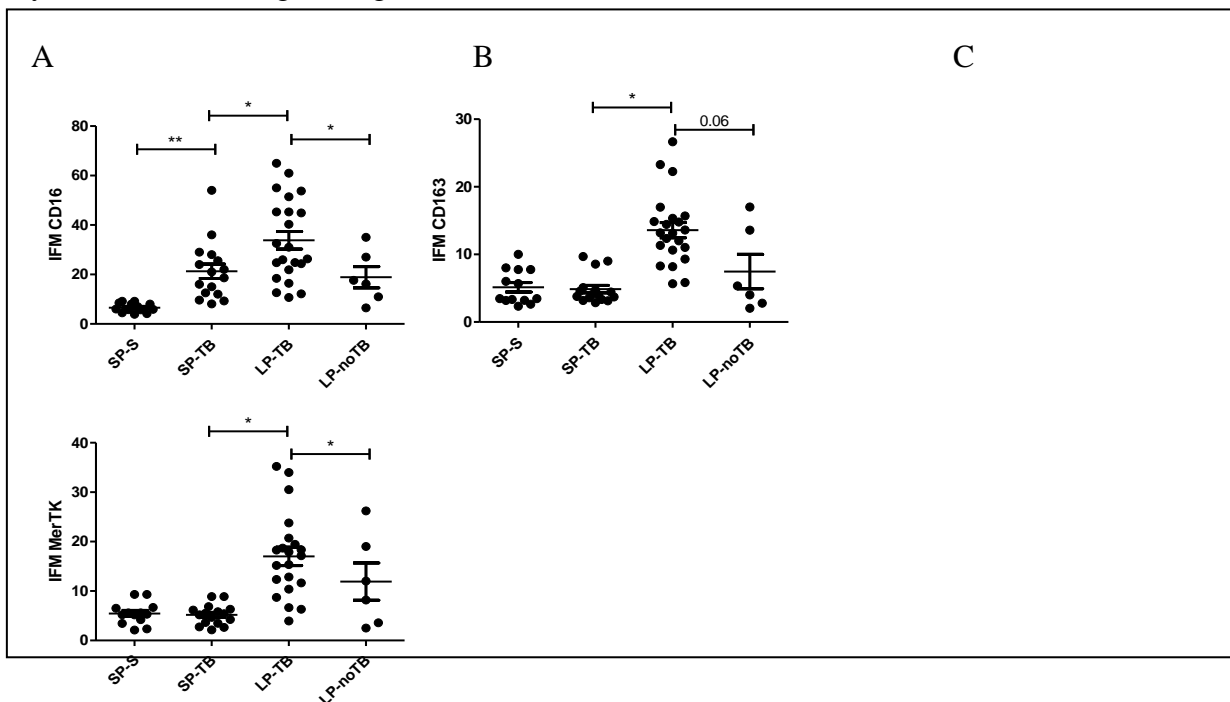
Los biomarcadores son, por definición, mediciones e indicadores de un sistema biológico, de un proceso patogénico o de uno farmacológico en respuesta a una intervención terapéutica. Actualmente la clínica y la radiografía de tórax son las herramientas más usadas para la evaluación de los pacientes, mientras que la baciloscopia y la conversión del cultivo de esputo a los dos meses de tratamiento son los marcadores para evaluar la carga bacteriana y la efectividad del tratamiento. Sin embargo, son necesarios biomarcadores más robustos para mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento de la TB y así evitar las limitaciones mencionadas.

Previamente hemos demostrado que la infección con Mtb a nivel pulmonar es capaz de impactar a nivel sistémico en los monocitos circulantes alterando la distribución de las subpoblaciones existentes y condicionando su ulterior capacidad de diferenciación hacia células dendríticas (5, 6). Asimismo, los monocitos de pacientes con TB presentan una predisposición basal a generar macrófagos con función inmunosupresora. Entre las moléculas que están incrementadas en dichos macrófagos se encontraron: CD16, CD163 y MerTK. Estas moléculas han sido asociadas al estado anti-inflamatorio de los macrófagos humanos, denominado M2c. Adicionalmente en trabajos preliminares de nuestro laboratorio confirmamos la presencia de células macrofágicas con fenotipo M2c en derrames pleurales de pacientes con TB. Es por ello que consideramos relevante evaluar la abundancia de CD16, MerTK y CD163 en monocitos circulantes y sus formas solubles plasmáticas como posibles biomarcadores de la TB. En este sentido, en el presente proyecto estudiamos si las moléculas asociadas al fenotipo de monocitos inmunosupresores (CD16, MerTK y CD163) pueden emplearse como biomarcadores de la TB. Para ello, propusimos: 1) comparar la abundancia de los marcadores CD16, MerTK y CD163 en monocitos y sus formas solubles plasmáticas en individuos sanos no infectados, sanos infectados (infección latente), o enfermos con tuberculosis al inicio y al

final del tratamiento; y 2) determinar asociaciones entre la abundancia de dichos marcadores y parámetros clínicos en pacientes enfermos con TB.

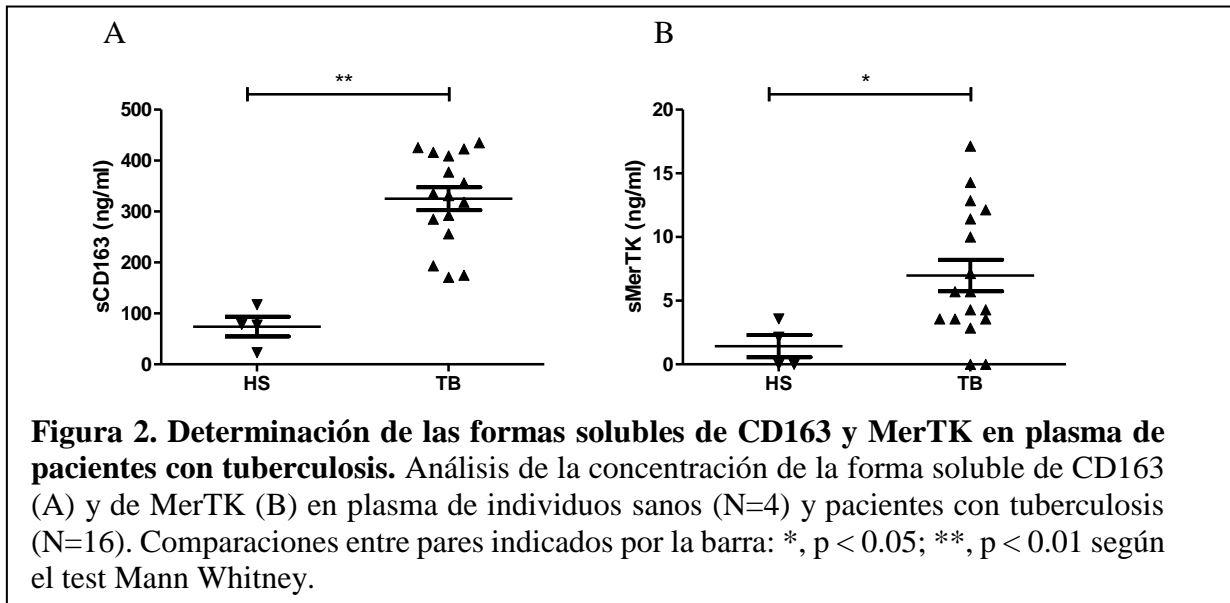
De acuerdo a nuestros antecedentes, evaluamos expresión de los marcadores asociados al perfil inmunosupresor tales como CD16, CD163 y MerTK en los monocitos (CD14<sup>pos</sup>) de pacientes con tuberculosis (TB) y de individuos sanos (S). En la figura 1 puede observarse que los monocitos de pacientes con TB presentaron niveles mayores de CD16, y no presentaron diferencias con respecto CD163 y MerTK en comparación con los monocitos de S. Luego decidimos evaluar si el fenotipo inmunosupresor podía desarrollarse en el curso de la infección natural. Para ello, determinamos la expresión de los marcadores en células CD14<sup>pos</sup> (monocitos/macrófagos) presentes en el líquido pleural (LP) de pacientes con pleuresía tuberculosa (LP-TB) o de etiología no tuberculosa (LP-noTB). En la pleuresía tuberculosa el espacio pleural es el sitio fisiológico donde tiene lugar el exudado inflamatorio asociado a la infección. El proceso inflamatorio resulta en un aumento de la permeabilidad vascular pleural, lo cual conduce a la acumulación de líquido enriquecido en proteínas y factores inmunomoduladores, por lo tanto se considera que el espacio pleural proporciona una excelente modelo para estudiar los factores locales inducidos en respuesta a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Observamos un incremento en la expresión de CD16, MerTK y CD163 en células CD14<sup>pos</sup> obtenidas a partir del LP de pacientes con TB en comparación de la expresión hallada en monocitos de sangre periférica (Figura 1).

Adicionalmente el aumento de la expresión de los marcadores CD16, CD163 y MerTK en las células CD14<sup>pos</sup> se encontró asociado específicamente en el caso de LP tuberculoso y no en otras etiologías (Figura 1).

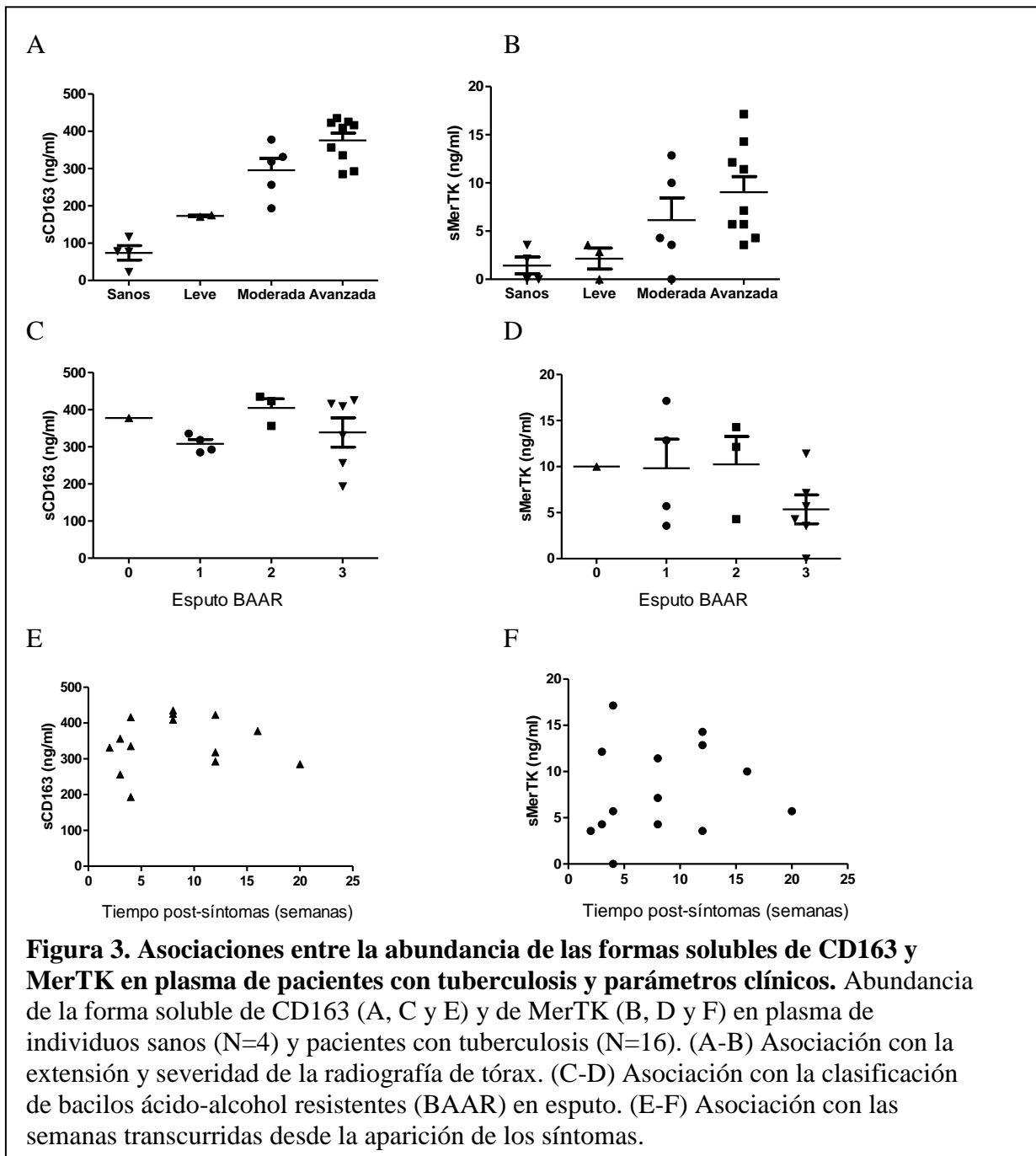


**Figura 1. Fenotipo de las células CD14 positivas presentes en sangre periférica y en líquido pleural de pacientes con TB.** (A-C) Expresión de CD16 (A), CD163 (B) y MerTK (C) en células CD14<sup>pos</sup> presentes en sangre periférica de individuos sanos (SP-S, N=13) o de pacientes (SP-TB, N=16), y en LP de pacientes con TB (LP-TB, N=22) o no TB (LP-noTB, N=6). Comparaciones entre pares indicados por la barra: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; según el test Kruskal-Wallis seguido de las comparaciones de Dunn.

Una posible explicación para la falta de expresión de los receptores (MerTK y CD163) en monocitos circulantes es que hayan sido clivados mediante un fenómeno de *shedding*. Teniendo en cuenta que mediante citometría de flujo detectamos las formas moleculares asociadas a las células, sería importante complementar estos resultados midiendo también las formas solubles. Para ello determinamos la presencia de la forma soluble de CD163 y de MerTK (sCD163 y sMerTK) en plasma de pacientes con TB mediante ELISA. Como se puede observar en la Figura 2, los pacientes con TB presentan niveles mayores de sCD163 y de sMerTK en plasma respecto de los controles sanos.



Adicionalmente observamos que dichos valores son variables dentro del grupo experimental de pacientes con TB. Es por ello que comenzamos a elaborar los análisis de asociación entre dichas variables y algunos parámetros clínicos de los pacientes. Los parámetros clínicos incluidos hasta el momento fueron: la extensión y severidad radiológica, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en esputo y el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas.



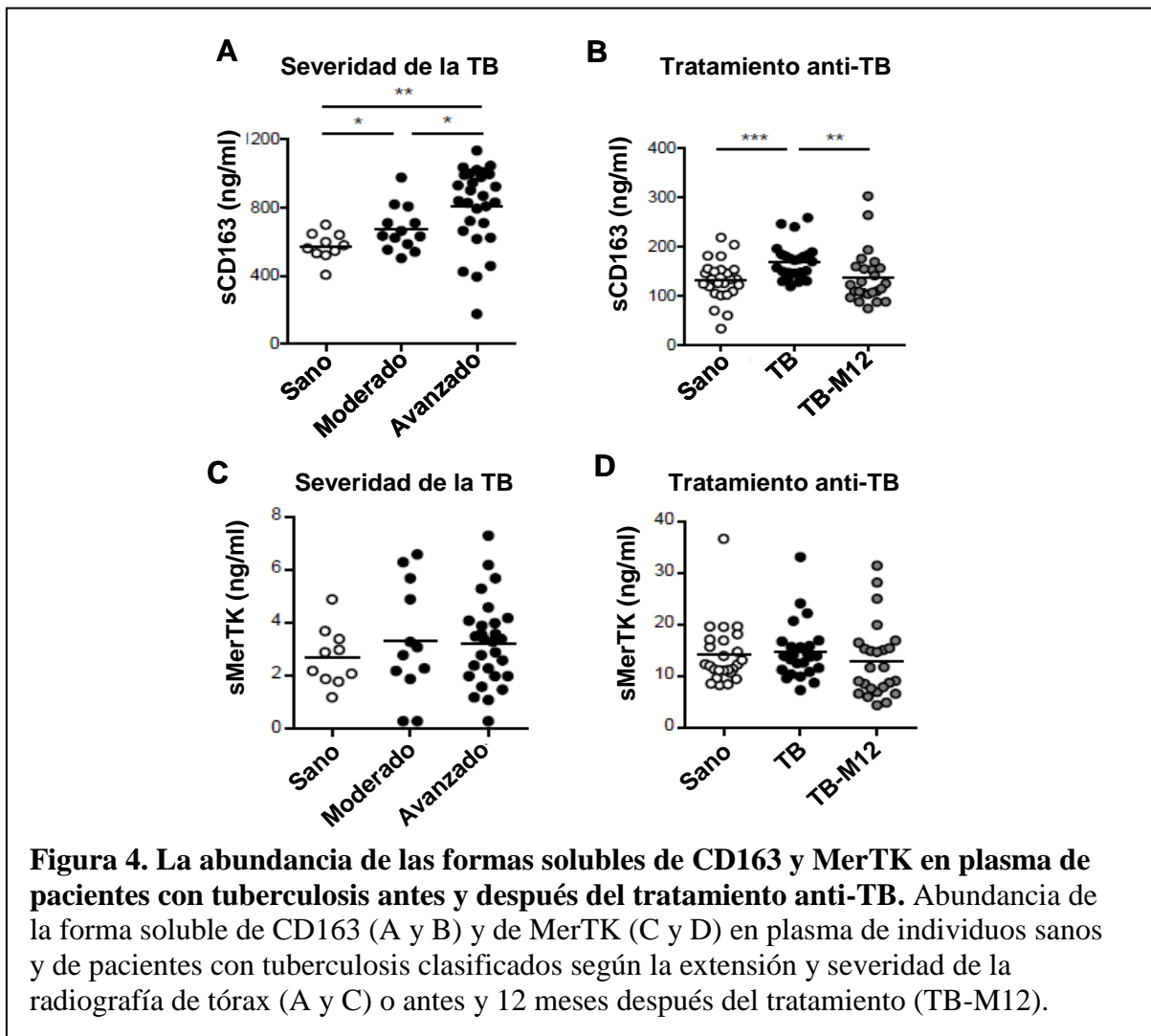
Para la determinación de la extensión y severidad radiológica, los médicos clasificaron a los pacientes en 3 grupos: “leves” para pacientes sin cavidades pulmonares, “moderados” para pacientes con cavidades unilaterales o limitadas y “avanzados” para pacientes con cavidades bilaterales o unilaterales extendidas. Para la clasificación de los pacientes según el BAAR, se tuvo en cuenta la escala propuesta por la Unión Internacional contra la tuberculosis y las enfermedades pulmonares (IUATLD)/ Organización Mundial de la Salud (WHO).

Como puede apreciarse en la figura 3, hemos encontrado una correlación positiva entre la abundancia de las formas solubles de CD163 y MerTK y los hallazgos radiológicos. Los pacientes con imágenes radiológicas más severas presentaron mayores

concentraciones de las formas solubles de CD163 y MerTK en plasma. Sin embargo, no hallamos diferencias significativas entre la magnitud BAAR ni el tiempo de evolución de los síntomas.

Procedimos luego a evaluar la abundancia de las formas solubles de CD163 y MerTK en plasma de pacientes antes y después del tratamiento anti-tuberculoso, definidos como:  
ANTES: muestras de sangre tomadas entre los 3 y 10 días desde el inicio del tratamiento con antibióticos  
DESPUES: muestras de sangre pareadas tomadas 12 meses luego de tratamiento y con negativización del esputo confirmada (tratamiento eficaz).

Como puede observarse en la figura 4A-B, la abundancia de CD163 soluble se asoció positivamente con la severidad radiológica de la enfermedad en pacientes con TB y con el éxito del tratamiento siendo que los niveles plasmáticos disminuyeron 12 meses luego del tratamiento resultando comparables con los valores hallados en individuos sanos. Sin embargo, la abundancia de la forma soluble de MerTK no se asoció con la severidad radiológica ni con el éxito del tratamiento (Figura 4C y D).



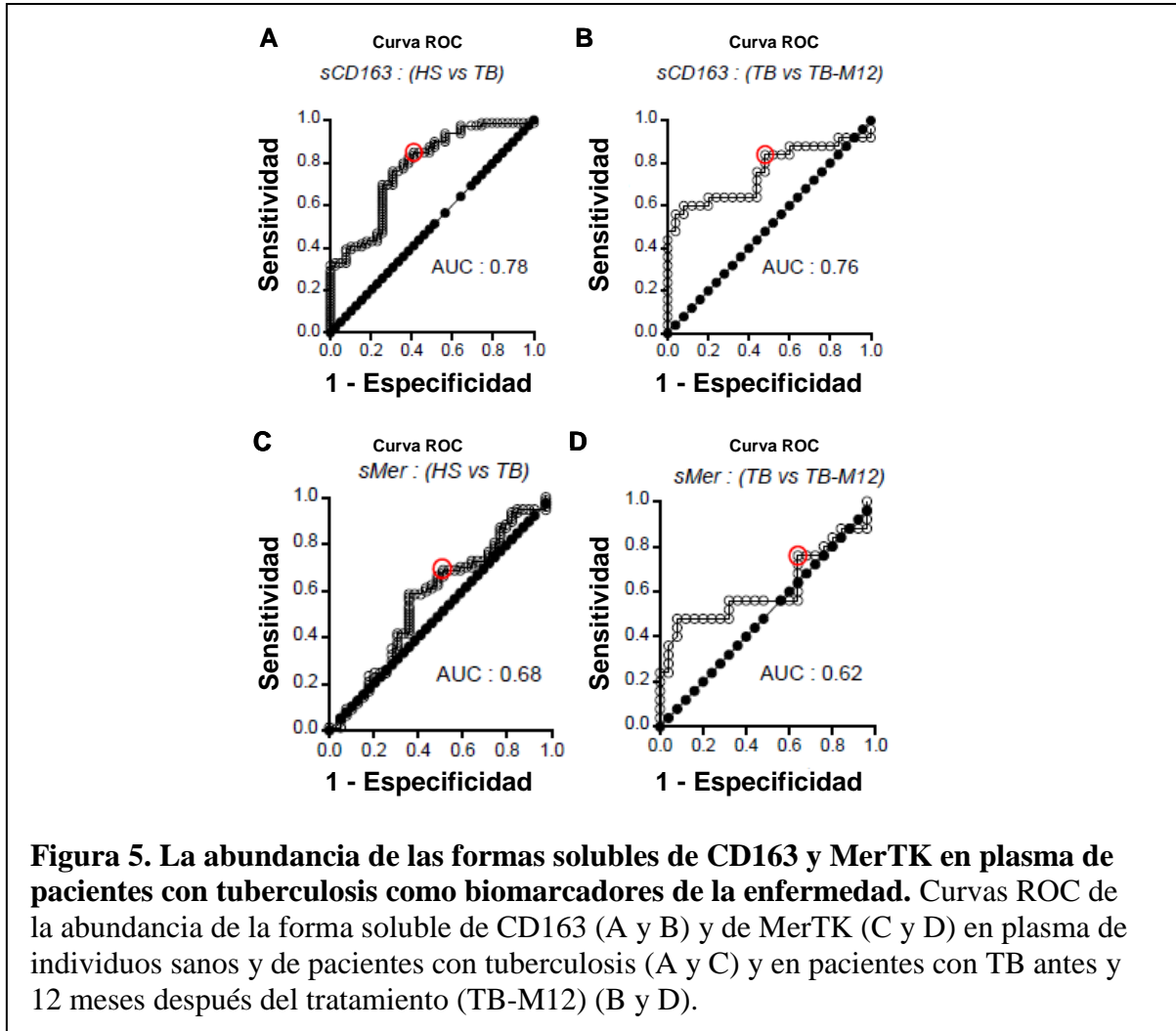
**Figura 4. La abundancia de las formas solubles de CD163 y MerTK en plasma de pacientes con tuberculosis antes y después del tratamiento anti-TB. Abundancia de la forma soluble de CD163 (A y B) y de MerTK (C y D) en plasma de individuos sanos y de pacientes con tuberculosis clasificados según la extensión y severidad de la radiografía de tórax (A y C) o antes y 12 meses después del tratamiento (TB-M12).**

Con el objetivo de evaluar el potencial uso de las formas solubles de CD163 y de MerTK como biomarcadores de la enfermedad, realizamos las curvas ROC relacionando la



sensibilidad y la especificidad de las formas solubles de CD163 y de MerTK entre individuos sanos y pacientes con tuberculosis (Figura 5A y C) o entre pacientes con TB antes y después del tratamiento (Figura 5B y D).

Como puede apreciarse en la Figura 2, la forma soluble de CD163 presenta valores de AUC (Área Bajo la Curva) de 0.78 y 0.76 para sanos vs TB o antes vs después del tratamiento respectivamente. Los valores de AUC obtenidos para la forma soluble de MerTK son menores (0.68 y 0.62 respectivamente).



En base a estos resultados proponemos a CD163 soluble como biomarcador de la severidad de la enfermedad y del éxito del tratamiento.

Teniendo en cuenta que la existencia de biomarcadores que puedan correlacionarse robustamente con la presencia de infección, de enfermedad activa y de respuesta al tratamiento indicado es una necesidad imperiosa en el campo de la tuberculosis, creemos que estos aportes de este proyecto podrían impactar directamente en la práctica clínica modificando el tiempo y/o esquema de tratamiento, así como también en estudios clínicos al permitir evaluar rápidamente la respuesta al tratamiento con nuevos fármacos y/o la eficacia de nuevas vacunas.

## Referencias

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Epidemiology. WHO report 2016.
2. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000;161: 1376–95.
3. Wallace RM, et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:1016–22.
4. Van den Boogaard J, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:849–62.
5. Balboa L, et al. *Eur J Immunol.* 2013, 43(2): 335-47.
6. Balboa L, et al. *J Leukoc Biol.* 2011, 90(1): 69-75
7. Pablos-Mendez A. Working alliance for TB drug development, Cape Town, South Africa, February 8th, 2000. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:489–90.
8. Ziakas PD, Mylonakis E. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1883–9.
9. Cardona PJ. RUTI: Tuberculosis (Edinburgh, Scotland). 2006. 1;86:273–89.

## Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* is a highly virulent human pathogen that infects approximately one third of the world's population. Currently, clinical evaluation and chest radiography are the most used tools for the evaluation of patients with tuberculosis, while sputum smear microscopy and conversion at two months are the markers to evaluate the bacterial load and the effectiveness of the treatment. However, more robust biomarkers are needed to improve both the diagnosis and treatment of tuberculosis.

Previously we demonstrated that the pulmonary infection with *M. tuberculosis* impact on circulating monocytes by altering the distribution of their subpopulations and driving monocytes more prone to generate immunosuppressive macrophages. These immunosuppressive macrophages displayed high expression of CD16, CD163 and MerTK. Based on these findings, we aimed to evaluate the abundance of CD163 and MerTK in circulating monocytes and of their soluble forms in plasma as potential biomarkers for tuberculosis.

Firstly, we observed an increased expression of CD16, MerTK and CD163 in CD14<sup>pos</sup> cells found in the pleural fluid of patients with tuberculosis compared to peripheral blood or pleural fluids associated to different etiologies. These results demonstrate that the macrophages show an immunosuppressive phenotype at least in terms of the expression of CD16, MerTK and CD163 at the site of infection by *M. tuberculosis* (pleural compartment). No differences in the expression of CD163 or MerTK were found in circulating monocytes from patients with tuberculosis compared to those isolated from healthy individuals. Taking into account that these receptors can be cleaved in blood, we determined the abundance of the soluble forms of CD163 and MerTK (sCD163 and sMerTK respectively) in plasma. Interestingly, we found that the molecules sCD163 and sMerTK were increased in the plasma of patients with tuberculosis compared to healthy individuals. Additionally, both parameters were positively associated with the severity of the thorax radiological findings and with the sputum negativization after antituberculous treatment. Accordingly to the ROC curve statistical method, sCD163 has a better performance as a biomarker of tuberculosis compared to sMerTK. We consider that the evaluation of the abundance of plasma sCD163 in conjunction with other parameters could impact clinical practice by modifying the time and / or treatment scheme, as well as in clinical studies, allowing to quickly evaluate the response to treatment with new drugs and / or the effectiveness of new vaccines.

# PRIMER ESTUDIO GENÉTICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN UNA POBLACIÓN DE LA ARGENTINA, ZONA SURESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Virginia Bañares<sup>1</sup>, Pablo Corral<sup>2</sup>, Laura Schreier<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética Experimental, Centro Nacional de Genética Médica "Dr Eduardo Castilla", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr Carlos Malbrán", Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> Universidad FASTA, Facultad de Medicina, Cátedra de Farmacología, Mar del Plata, Argentina

<sup>3</sup> Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Bioquímica Clínica. Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Buenos Aires, Argentina

## Resumen

La hipercolesterolemia Familiar (HF) es una enfermedad hereditaria con alto riesgo de Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica (ECA) precoz, que afecta a 1/300 individuos. Se origina por mutaciones en tres genes principales: el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR), la apoproteína B (APOB), la proproteína convertasa subtilisina kesina 9 (PCSK9). En este trabajo realizamos el estudio genético en individuos residentes en la zona sureste de la provincia de Buenos Aires con alta sospecha clínica de HF con puntaje de la escuela Holandesa de Lípidos (DLCN) de 6 o mayor. Se evaluaron con secuenciación de próxima generación los genes LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1 y APOE en 68 muestras de ADN. En 22/68, 32%, casos se identificaron variantes genéticas. El 82% en el gen LDLR, 14% en APOB y 9% en APOE. El 62% de los pacientes con fenotipo "definitivo" de HF presentó variantes. El 14% de los casos con variantes genéticas presentaba xantomas, DUCH mayor a 8 y variantes en el gen LDLR. El 41% de los casos con variantes genéticas presentó arco corneal. Se detectaron un total de 23 variantes VUS, LP o P, 2 grandes rearrreglos y no se observó la variante libanesa. Tres variantes se observaron en más de un caso: c.1027G>A, c.1567 G>A ambas en el LDLR, y APOE c.890T>C. Dos variantes fueron noveles, LDLR c.2231\_2232delGAinsAG y APOE c.890T>C. Estos resultados muestran la gran heterogeneidad de variantes genéticas de HF presentes en nuestra población y sugieren que también podría haber variabilidad entre distintas regiones del país, contribuyen a la identificación de variantes en nuestra población y nos permite iniciar el estudio en cascada familiar de las variantes identificadas facilitando la posterior identificación temprana de familiares portadores aplicando una estrategia costo efectiva conveniente.

## Introducción

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es una enfermedad hereditaria con alto riesgo de Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica (ECA) precoz, que afecta en promedio a 1/300 individuos<sup>1</sup>, con un patrón de herencia dominante con fuerte efecto de dosis y una penetrancia de casi el 100%. Su evolución es silenciosa y transcurre con niveles elevados de colesterol plasmático y suele presentarse con un evento cardiovascular en la cuarta o

quinta década de la vida. Sin el tratamiento adecuado el riesgo de un evento fatal en los jóvenes es 100 veces mayor respecto de la población general<sup>2</sup>.

Los signos clínicos típicos, xantomas y arco corneal, aparecen sólo en un 30% de los casos y en forma tardía. La presentación variable en distintos individuos hace difícil su identificación, especialmente en los jóvenes, en consecuencia, muchos casos no son detectados y efectivamente tratados, lo que representa un vacío en la medicina preventiva<sup>3</sup>  
<sup>4</sup>.

Los datos internacionales indican que el 80 % de los pacientes no están identificados. En el consenso internacional 2013 de la *European Atherosclerosis Society* se estableció que es una enfermedad subdiagnosticada y por consiguiente subtratada<sup>5</sup>.

El diagnóstico inicial se basa en diferentes criterios clínicos, donde se evalúan los antecedentes cardiovasculares personales, familiares, estigmas clínicos característicos como los xantomas tendinosos y el arco corneal precoz y los niveles plasmáticos de c-LDL. Los criterios de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesas (Criterios DUTCH o DLCN) son los más ampliamente utilizados. Un valor mayor a 8 puntos califica al paciente como "definitivo" para el diagnóstico de HF y valores de 6 a 8 "probable"<sup>6</sup>.

Funcionalmente el aclaramiento de las LDL en plasma se ve disminuido, aumentando el nivel de colesterol de LDL y favoreciendo la aterosclerosis y ECA prematura. La anomalía se origina por mutaciones en tres genes principales: el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR), la apoproteína B (APOB) y la proproteína convertasa subtilisina kesina 9 (PCSK9). Mutaciones en el gen de la proteína de tipo 1 relacionada al receptor (LDLRAP1) conducen a la forma recesiva de la enfermedad, conocida como Hipercolesterolemia autosómica recesiva (ARH) que presenta el mismo fenotipo. Más del 90% de las mutaciones conocidas están en el LDLR y son más de 2900 y la mitad de ellas son únicas<sup>7</sup>. En el 50-70% de los casos con fenotipo de HF se encuentran mutaciones en los genes mencionados. En los casos negativos, se plantea que mutaciones en otros genes, como APOE, STAP1, ABCG5, ABCG8, CYP27A1, LIP, LIPC, LIPA, u otros podrían originar también la enfermedad<sup>8</sup>.

La identificación genética de la mutación causal en una persona permite comprobar la presencia de la enfermedad y, en el caso de las mutaciones que producen receptores no funcionales, la evolución esperada. En los homocigotas, conocer las mutaciones y los genes defectuosos contribuye en la elección de las nuevas terapéuticas hoy disponibles, basadas en oligonucleótidos antisense de apob o anticuerpos monoclonales inhibidores de la pcsk9. Sin embargo, el mayor valor del análisis genético radica en el estudio en cascada familiar. Este consiste en realizar el análisis genético al caso índice de una familia, y luego, simplemente rastrear la mutación identificada entre los familiares con lazo sanguíneo aplicando técnicas simples y de bajo costo. De esta manera se pueden identificar portadores en estadios iniciales, preclínicos y prevenir los eventos cardiovasculares mediante un tratamiento precoz, remarcando que los pacientes con HF conservan un memoria metabólica de la historia de exceso de LDL colesterol<sup>5</sup>. La relación costo-beneficio de esta estrategia ya ha sido ampliamente demostrada, la OMS y las sociedades europea e internacional de aterosclerosis recomiendan el abordaje de la enfermedad en un contexto familiar. Algunos países han iniciado programas gubernamentales en este sentido, como Holanda desde 2004 o Uruguay desde 2013.

En este trabajo realizaremos el estudio genético de HF en individuos residentes en la zona sureste de la provincia de Buenos Aires con alta sospecha clínica de la enfermedad como parte del primer estudio de prevalencia de HF en una población de Argentina.

## Población de estudio, Material y Métodos

Se evaluaron 247 pacientes hipercolesterolémicos incluidos en el Programa de Detección de Hipercolesterolemia Familiar en la Argentina (Estudio Da Vinci), llevado a cabo en el Partido de General Pueyrredón, Provincia de Buenos Aires. Los participantes presentaron niveles de colesterol >300 mg/dL y/o c-LDL >190 mg/dL y otorgaron su consentimiento informado para su evaluación clínica, bioquímica y genética. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética, Res CD FFyB Res, resolución 4705, exp-UBA 0064845/14 y CD 1762/17.

De cada paciente se obtuvo su historia familiar y personal con especial foco en enfermedad cardiovascular aterosclerótica (angina de pecho, infarto de miocardio, cirugía de revascularización miocárdica, accidente cerebro-vascular y/o enfermedad vascular periférica o carotídea), hospitalizaciones, hipertensión, diabetes mellitus, y tratamiento hipolipemiante actual. Se les efectuó un cuidadoso examen físico, con especial dedicación a la detección de xantomas tendinosos y/o arco corneal. Cuando estaban disponibles, se obtuvieron estos datos clínicos de familiares de primer grado (padres, hijos y hermanos). Se consideró enfermedad cardiovascular prematura como la presencia de alguna de las manifestaciones de enfermedad cardiovascular aterosclerótica mencionadas previamente antes de los 55 años para hombres y antes de los 65 para mujeres. Se aplicaron los criterios de la Red de Clínicas de Lípidos Holandesas, (DLCN según siglas en inglés), considerando el mayor valor de c-LDL registrado<sup>6</sup>. Un total de 40% de pacientes recibían tratamiento hipolipemiante, y cuando no se disponía del valor de máximo de c-LDL sin tratamiento, se aplicó una corrección basada en dosis y tipo de estatina<sup>9</sup>.

Se excluyeron 21 sujetos por los siguientes criterios de exclusión aplicados: n=8 presentaron un valor de TSH >10 mUI/L, 4 con creatinina >1.7mg/dL, 2 con fosfatasa alcalina >200 U/L, un paciente con triglicéridos >1,000 mg/dL, 3 mujeres excluidas por embarazo y 3 pacientes se opusieron a la toma de muestra de sangre. Por lo tanto, finalmente se seleccionaron 72 casos, 28 con DLCN de 6-7 y 44 con DLCN  $\geq$ 8. Se extrajeron las muestras de sangre y se obtuvo el ADN por el método salino de "salting out" en 68 muestras.

Se realizó la secuenciación de los genes LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1 y APOE con secuenciación de próxima generación (NGS) empleando el kit de captura de Illumina "Nextera Rapid Capture Custom Enrichment" para la obtención de la biblioteca de segmentos de ADN y se secuenció en un equipo MiSeq Dx de Illumina por la técnica de "paired end reads". La cobertura media obtenida fue de 600X. Las variantes se anotaron utilizando el programa Ingenuity de Qiagen. Las variantes se identifican por comparación de la secuencia obtenida con la secuencias de referencia, (GRCh37 o Hg19), siendo estas NM\_000527.4, NM\_000384.2, NM\_174936.3, NM\_015627.2 y NM\_000041.2. Para validar el panel de genes se compararon los resultados obtenidos en un grupo de 12 muestras portadoras de distintas mutaciones en los genes LDLR y APOB que previamente se habían estudiado con secuenciación de sanger. Los resultados fueron coincidentes, y además, en dos muestras se identificaron mutaciones previamente no identificadas porque mapeaban en zonas no estudiadas con Sanger. En uno de los casos, en un exón del gen LDLR que no se había secuenciado porque ya había una variante causal de HF identificada en ese caso; y en el otro caso, dos variantes, una en el gen APOE y otra en el gen APOB en un exón que no se había estudiado (APOB es uno de los genes más grandes del genoma, por lo cual su abordaje completo se realiza con NGS). Esto nos muestra que la secuenciación genómica que se empleará no solo detecta las

mismas variantes que la técnica de Sanguer (*gold standard*) sino que también resulta más efectiva ya que permite analizar todos los exones de los genes y a su vez incluir más genes.

Finalmente se implementó análisis bioinformático de variaciones en el número de copias (CNV) para identificar deleciones o inserciones de más de 15 bases<sup>10</sup>. En el análisis *in silico* de las variantes nuevas se aplicaron los programas *Polyphen2*, *SIFT* y *PROVEAN*. Las variantes identificadas se chequearon en las bases de referencias internacionales; British Heart Foundation LOVD y HGMD y para determinar su significancia clínica se aplicaron los criterios ACMG 2015.

## Resultados

De los 68 casos (47 (69%) mujeres y 21 (31%) hombres) estudiados genéticamente en 22 (32%) se identificaron variantes genéticas, 17 (77%) mujeres y 5 (23%) hombres. 18 de los 22 casos resultaron portadores de alguna variante en el gen LDLR (82%), 3 (14%) en el gen APOB y 2 (9%) en el gen APOE; y uno de los casos resultó ser un doble heterocigota APOB/APOE.

De los 21 pacientes con fenotipo "definitivo" de HF (con puntaje mayor a 8) 13 (62%) presentaron variantes. De los 47 casos con fenotipo "probable de HF, 9 presentaron variantes (20%).

El 14% (3) de los casos con variantes genética presentaba xantomas, todos con puntaje mayor a 8 y variantes en el gen LDLR. El 41% (9) e los casos con variantes genéticas presentó arco corneal, 7 con variantes en LDLR, una en APOB y una en APOE.

La descripción de las variantes identificadas en cada caso, y las principales características de los mismos se resumen en la Tabla 1.

Se detectaron un total de 23 variantes VUS, LP o P, no describimos las variantes benignas observadas. De las 18 variantes en el gen LDLR, 2 (11%) fueron grandes rearrreglos: una duplicación y una deleción involucrando ambas más de un exón; de las 16 restantes solo una mapeó en un intrón, el resto en exones, 2 fueron indels (11%) (una de ellas corresponde a la variante intrónica) y 14 variantes puntuales de cambio de sentido (78%). En el gen APOB se observaron 3 variantes de cambio de sentido y 2 en APOE. No se observó la variante libanesa.

Tres variantes se observaron en más de un caso: 4 pacientes portadores de c.1027G>A y 2 pacientes con c.1567 G>A ambas en el LDLR, y 2 pacientes portadores de APOE c.890T>C, uno de ellos porta también una variante en APOB. Dos variantes fueron noveles, LDLR c.2231\_2232delGAGinsAG y APOE c.890T>C.

**Tabla 1: Variantes genéticas identificadas, score clínico y características fenotípicas de cada caso con puntaje DLCN a partir de 6**

DUTCH	Variante Genética	Cigosidad	Gen	Clasificación*	C-LDL	Xantoma	Arco Corneal	Género
6	c.1027G>A (p.G343S)	het	LDLR	LP	191	no	no	M
7	c.1027G>A (p.G343S)	het	LDLR	LP	250	no	no	F
7	c.1784G>A (p.R595Q)	het	LDLR	VUS	255	no	no	F
7	c.2231_2232delGAGinsAG(p.R744Q)	het	LDLR	VUS	165	no	no	F
7	c.846C>A, (p.F282L)	het	LDLR	LP	247	no	si	F
8	c.191-3_191-2insA	het	LDLR	VUS	210	no	no	F
9	c.1027G>A (p.G343S)	het	LDLR	P	260	no	si	F
9	c.1567G>A (p.V523M)	het	LDLR	LP	251	no	si	F
9	c.1895A>T (p.N632I)	het	LDLR	LP	244	no	si	M
9	c.68-?_1186+? (p.V23_V395dup)	dup	LDLR	P	407	si	si	F
9	c.977C>G (p.S326C)	het	LDLR	VUS	311	no	no	F
10	c.1027G>A (p.G343S)	het	LDLR	P	222	no	no	M
10	c.1567G>A (p.V523M)	het	LDLR	LP	273	no	si	F
11	c.1118G>A (p.G373D)	het	LDLR	P	251	no	no	F
11	c.1475A>G (p.D492G)	het	LDLR	LP	321	no	si	F
11	c.2312-?_2583+? del (p.781_?*del)	het	LDLR	P	400	no	no	F
14	c.428G>T (p.C143F)	het	LDLR	LP	361	si	no	F
14	c.646T>C (p.C216R)	het	LDLR	LP	401	si	no	F
6	c.10580G>A (p.R3527Q)	het	APOB	P	220	no	no	M
7	c.11466G>A (p.V3822V)	het	APOB	VUS	128	no	si	F
10	c.10163C>T (p.T3388I) (;) c.890T>C (p.L297P)	het (;) het	APOB (;) APOE	LP (;) VUS	258	no	no	F
7	c.890T>C (p.L297P)	het	APOE	VUS	221	no	si	M

DUTCH: criterios de las Clínicas Holandesas de Lípidos; het: heterocigosis; VUS: variante de significado incierto; P: variante patogénica; LP: variante tipo patogénica; \*: clasificación según criterios ACMG 2015 para variantes genéticas en patologías con herencia mendeliana monogénica; F: femenino; M: masculino.

## Discusión

La proporción de pacientes en los cuales se identificó una variante genética asociada a la hipercolesterolemia que presentaban, 32%, resultó un poco bajo respecto de los reportados en otras poblaciones, pero si consideramos a los casos con puntaje mayor a 8, que corresponde a un diagnóstico clínico "definitivo" la detección alcanza el 62%. Los casos sin variantes identificadas se explican porque es posible que mutaciones en zonas muy profundas de los intrones o en otros genes, no cubiertas por el panel de genes aplicado, podrían causar el fenotipo, y también hay que considerar la posibilidad de un origen poligénico. Un 77% de los casos con variantes fueron mujeres, en concordancia con la proporción de géneros observada en la población de este trabajo.

El 82% de las variantes identificadas mapeó en el gen LDLR, seguido por un 14% en APOB, en concordancia con otros reportes <sup>5</sup>.

Uno de los casos fue un doble heterocigota APOB/APOE; LP/VUS, dado que el fenotipo concuerda con el de las formas heterocigotas es posible que la variante APOE c.890T>C no se asocie al fenotipo, sin embargo resta estudiar la segregación de las variantes y la relación fenotipo-genotipo en la familia para obtener más información para su correcta clasificación. En este sentido es importante destacar que esta variante se identificó en otro caso de este estudio y también resta estudiar a la familia.



Como es de esperarse en el grupo con mayor puntaje DLCN se identificaron más variantes genéticas respecto del grupo que le sigue, 62% y 20% respectivamente<sup>11</sup>.

Todos los casos con xantomas fueron portadores de alguna variante y tenían puntaje DLCN de 8 o más, pero solo el 14% de los casos con variantes presentaba xantomas, indicando que son un excelente marcador cuando están presentes pero que aparecen en pocos casos, en coincidencia con lo que se plantea actualmente. El arco corneal se observó más ampliamente, 41%, en portadores de variantes en LDLR, APOB y también en el heterocigota APOE con la variante antes mencionada.

La HF carece de efectos fundadores en el gen LDLR que faciliten el abordaje genético y esto se manifiesta en la gran heterogeneidad de variantes que se conocen, en este trabajo identificamos 13 variantes distintas en el LDLR, 2 de ellas en más de un caso. Llama la atención que 4 casos de la misma región geográfica porten la misma variante, c.1027G>A; y dos casos porten la variante c.1567G>A, sin embargo los pacientes no manifestaron tener alguna relación familiar; una variante fue novel y observamos un caso con la variante c.1895>T que describimos previamente como novel en nuestra población y este es el tercer caso portador que identificamos. Por el contrario en el gen APOB si hay un efecto fundador, la variante c.10580G>A (p.R3527Q) es más frecuente entre los caucásicos, y se observó en un caso en este trabajo y ya la habíamos observado en nuestra población previamente<sup>12</sup>. La variante en APOE también se observó en dos casos y no fue reportada previamente.

Finalmente, en este grupo de pacientes no observamos la variante libanesa, que la habíamos encontrado en el 18% de los casos en un estudio previo<sup>12</sup>. Sin embargo hay que considerar que una muestra del estudio anterior proveniente de la misma región portaba la variante libanesa.

Entre las limitaciones de este trabajo debemos mencionar que resta analizar otros genes asociados al metabolismo del colesterol, como LIP, LIPA, CYP27A1, STAP1, ABCG5, ABCG8 entre otros, y también los puntajes de LDL elevado basados en polimorfismos ubicados en genes relacionados que explicarían un origen poligénico de la HF, en este sentido se plantearon recientemente dos puntajes<sup>13 14</sup>.

Estos resultados muestran la gran heterogeneidad de variantes genéticas de HF presentes en nuestra población y sugieren que también podría haber variabilidad entre distintas regiones del país, contribuyen a la identificación de variantes en nuestra población y nos permite iniciar el estudio en cascada familiar de las variantes identificadas facilitando la posterior identificación temprana de familiares portadores aplicando una estrategia costo efectiva muy conveniente recomendada por la OMS.

## **Bibliografía**

---

<sup>1</sup> Familial hypercholesterolaemia. Defesche JC1, Gidding SS2, Harada-Shiba M3, Hegele RA4,5, Santos RD6,7, Wierzbicki AS8. Nat Rev Dis Primers. 2017 Dec 7;3:17093. doi: 10.1038/nrdp.2017.93.

<sup>2</sup> Neil HA, Huxley RR, Hawkins MM, Durrington PN, Betteridge DJ, Humphries SE. Comparison of the risk of fatal coronary heart disease in treated xanthomatous and non-xanthomatous heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. Atherosclerosis 2003;170(1):73–8.

- 
- <sup>3</sup> Watts GF, Lewis B and Sullivan DR. Familial hypercholesterolemia: a missed opportunity in preventive medicine. [www.nature.com/clinicalpractice](http://www.nature.com/clinicalpractice) doi:10.1038/ncpcardio0941.
- <sup>4</sup> Detection of familial hypercholesterolaemia: a major treatment gap in preventative cardiology. Bates TR1, Burnett JR, van Bockxmeer FM, Hamilton S, Arnold L, Watts GF. *Heart Lung Circ.* 2008 Oct;17(5):411-3. Epub 2007 Aug 1. DOI:10.1016/j.hlc.2007.06.005
- <sup>5</sup> Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. *Eur Heart J* 2013;34:3478–3490. DOI: 10.1093/eurheartj/eh273
- <sup>6</sup> World Health Organization. Familial Hypercholesterolaemia. Report of a second WHO Consultation. Geneva: WorldHealthOrganization; 1999.
- <sup>7</sup> The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. Leigh S, Futema M, Whittall R, Taylor-Beadling A, Williams M, den Dunnen JT, Humphries SE. *J Med Genet.* 2017 Apr;54(4):217-223. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104054.
- <sup>8</sup> The Present and the Future of Genetic Testing in Familial Hypercholesterolemia: Opportunities and Caveats. Hooper AJ, Burnett JR, Bell DA, Watts GF. *Curr Atheroscler Rep.* 2018 May 19;20(6):31. doi: 10.1007/s11883-018-0731-0.
- <sup>9</sup> Clinical experience of scoring criteria for Familial Hypercholesterolaemia (FH) genetic testing in Wales. Haralambos K, Whatley SD, Edwards R, Gingell R, Townsend D, Ashfield-Watt P, Lansberg P, Datta DB, McDowell IF. *Atherosclerosis.* 2015 May;240(1):190-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis
- <sup>10</sup> Iacocca MA, Wang J, Dron JS, Robinson JF, McIntyre AD, Cao H, Hegele RA. Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2017 Nov;58(11):2202-2209.
- <sup>11</sup> Palacios L, Grandoso L, Cuevas N, Olano-Martín E, Martínez A, Tejedor D, Stef M. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis.* 2012 Mar;221(1):137-42. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.021. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22244043
- <sup>12</sup> Bañares VG, Corral P, Medeiros AM, Araujo MB, Lozada A, Bustamante J, Cerretini R, López G, Bourbon M, Schreier LE. Preliminary spectrum of genetic variants in familial hypercholesterolemia in Argentina. *J Clin Lipidol.* 2017 Mar - Apr;11(2):524-531. doi: 10.1016/j.jacl.2017.02.007. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28502510
- <sup>13</sup> Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, Harrison SC, Li K, Drenos F, Karpe F, Neil HA, Descamps OS, Langenberg C, Lench N, Kivimaki M, Whittaker J, Hingorani AD, Kumari M, Humphries SE. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet.* 2013 Apr 13;381(9874):1293-301. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62127-8.

---

<sup>14</sup> Wang J1, Dron JS1, Ban MR1, Robinson JF1, McIntyre AD1, Alazzam M1, Zhao PJ1, Dilliot AA1, Cao H1, Huff MW1, Rhainds D1, Low-Kam C1, Dubé MP1, Lettre G1, Tardif JC1, Hegele RA2. Polygenic Versus Monogenic Causes of Hypercholesterolemia Ascertained Clinically. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016 Dec;36(12):2439-2445.

# DETECCIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS CON IMPACTO EN SALUD HUMANA EN FRUTAS FINAS CULTIVADAS Y/O COMERCIALIZADAS EN NEUQUÉN, ARGENTINA

Oteiza JM, Jaureguiberry MV, Soto SA, Barril PA

Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI A.C.). CP 8309, Centenario, Neuquén, Argentina

## RESUMEN

La contaminación de los alimentos con virus entéricos es una de las principales causas de enfermedades de transmisión alimentaria. En las últimas décadas, las frutas finas han sido implicadas como el vehículo probable de infección en múltiples brotes de norovirus (NoV) y del virus de la hepatitis A (HAV). Estos alimentos a menudo reciben un procesamiento mínimo o nulo y están expuestos a la contaminación por virus en cada etapa de la producción. En un mundo crecientemente globalizado, las frutas finas tienen una amplia distribución y pueden dar origen a la propagación de enfermedades en puntos distantes del mundo. El objetivo de este trabajo fue conocer la calidad virológica de las frutas finas que se comercializan en Neuquén, Argentina. Un total de 99 frutas finas de distintas variedades se colectaron durante un período de 2 años (Enero 2016-Diciembre 2017). Las partículas virales se eluyeron y concentraron mediante precipitación con polietilenglicol siguiendo los lineamientos del método de referencia ISO/TS 15216-2. Se realizó la detección de genoma de NoV genogrupos I (GI) y II (GII), HAV, rotavirus (RV) y enterovirus (EV) mediante RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Las muestras positivas se amplificaron por RT-PCR convencional y los amplicones obtenidos se purificaron y secuenciaron en ambos sentidos. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit v7.2.5 y se realizó el análisis filogenético mediante Neighbor-Joining, modelo evolutivo kimura-2-parámetros, a través del programa MEGA6. Asimismo, se analizó la presencia de enterovirus infectivo (iEV) a través de la inoculación de los concentrados virales en células CaCo-2 y la posterior detección por inmunofluorescencia directa con un panel de anticuerpos monoclonales. Se detectó contaminación viral en 1/99 (1.0%) de las muestras de frutas finas analizadas, correspondiente a una muestra de frambuesas obtenida durante el otoño del año 2017. No se detectó presencia de virus entéricos en las demás variedades de frutas finas ensayadas, como así tampoco presencia de NoV GI, HAV, RV, EV ni iEV en las frutas finas comercializadas en Neuquén. Los datos obtenidos son los primeros en el país en relación a la detección de virus entéricos en frutas finas y revelan que los niveles de prevalencia de virus en estas matrices alimenticias son bajos. La información obtenida es útil como referencia para una evaluación de riesgos de transmisión de virus patógenos asociados al consumo de frutas finas.

## INTRODUCCION

Un derecho fundamental de todas las personas es tener acceso a una alimentación saludable e inocua para asegurar su crecimiento y desarrollo normal y mantener su salud a lo largo de toda la vida. La inocuidad de los alimentos es, por lo tanto, un elemento prioritario que involucra la salud pública, el bienestar de la población y la economía de todos los países.

Es un hecho real que, por distintos medios, los alimentos se pueden contaminar y así convertir en transmisores de enfermedades, en detrimento de su función esencial como fuente de nutrientes para una buena salud de quien los consume. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un problema cada vez más importante para la salud pública, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político. Cada año, ocurren 600 millones de casos de ETA y 420.000 muertes son atribuidas a las mismas (WHO, 2015).

A nivel mundial, los esfuerzos para estudiar y controlar las ETA se han centrado tradicionalmente en las enfermedades de origen bacteriano, mientras que las de origen viral, en general, han sido poco estudiadas. La principal razón es la escasa información sobre la frecuencia de contaminación de alimentos con agentes virales como así también las dificultades técnicas para la detección de virus en matrices alimenticias (Fleet et al., 2000). Sin embargo, en los últimos años ha habido grandes progresos en términos de la metodología diagnóstica, estableciéndose métodos oficiales a seguir durante el procesamiento de productos alimenticios (ISO/TS 15216-1:2017; ISO 15216-2:2013). Asimismo, uno de los principales avances respecto del control de virus en alimentos tuvo lugar mediante la publicación del Reglamento 925/2013 de la Unión Europea, a través del cual se dispone intensificar los controles oficiales de las importaciones de determinados piensos y alimentos de origen no animal. Así, en los últimos años se ha reconocido a los virus entéricos como una causa importante de brotes de ETA. Estos virus infectan vía el tracto gastrointestinal y son eliminados en las heces y otros fluidos biológicos, como la orina y vómitos, de personas infectadas. En materia fecal y vómitos son excretados en altas concentraciones, permanecen viables en el ambiente por largos períodos de tiempo y poseen una baja dosis infectiva (1-100 partículas), lo que da cuenta de su potencial patogénico. Los norovirus (NoV) y el virus de la hepatitis A (HAV) son los agentes virales asociados con mayor frecuencia a ETA (FAO/WHO, 2008). Otros agentes virales, entre los que destacan los rotavirus (RV) y enterovirus (EV), han sido también relacionados con ese tipo de enfermedades, aunque en menor extensión (Koopmans y Duizer, 2004).

El control sanitario de virus requiere definir en principio los productos alimenticios que deberían ser analizados en relación con su la presencia de virus. En las últimas décadas, las frutas finas congeladas han sido implicadas como el vehículo probable de infección en múltiples brotes de NoV y HAV. Estos productos a menudo reciben un procesamiento mínimo o nulo y están expuestos a la contaminación por virus principalmente en la etapa primaria de producción, a través de animales infectados o abonos contaminados (Ollimat y Holley, 2012). Además, los virus entéricos pueden encontrarse en aguas de irrigación, con la consecuente transmisión al cultivo cosechado (Beuchat, 2002). Asimismo, las frutas finas pueden contaminarse durante la manipulación post-cosecha, el transporte y el proceso de comercialización.

Las frutas finas poseen superficies complejas que impiden la eliminación de sustancias contaminantes mediante el simple lavado, lo que las convierte en alimentos de alto riesgo de transmisión de virus. En un mundo crecientemente globalizado, las frutas finas tienen una amplia distribución y pueden dar origen a la propagación de enfermedades en puntos distantes del planeta. En este sentido, la identificación temprana de los alimentos contaminados es de importancia a los fines de evitar la diseminación de patógenos virales en la comunidad.

En Argentina no se dispone de datos de virus entéricos prevalentes en alimentos ni de frecuencia de contaminación viral en estas matrices. Asimismo, sólo unos pocos centros de investigación en el país realizan análisis de virus en matrices alimenticias y al presente no existen laboratorios que presten servicios diagnósticos a la industria alimenticia en relación a la detección de patógenos virales.

Con el fin de poder contribuir con el manejo de riesgo, el establecimiento de normativas preventivas, de control y de protección de los alimentos y la salud de la población expuesta, el objetivo de este trabajo fue conocer la calidad virológica de las frutas finas cultivadas y/o comercializadas en Neuquén, a través de la detección de virus entéricos con impacto en salud humana.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Recolección de muestras.** Durante un período de dos años (Enero 2016 – Diciembre 2017) se colectaron muestras de frutas finas de diferentes especies: arándanos, frutillas, frambuesas, moras, corintos, grosellas y cassis). Se obtuvieron 50 g de muestras de plantas productoras o mercados de abastecimiento de frutas y verduras de la provincia de Neuquén.

**Elusión y concentración de virus.** Las muestras de frutas finas (25 g) fueron sembradas con 10 ul de calicivirus felino (FCV) utilizado como virus control de proceso y luego los virus fueron eluidos y concentrados mediante centrifugación y precipitación con polietilenglicol siguiendo los lineamientos de la norma ISO/TS 15216-2:2013.

**Detección de virus entéricos.** Los ácidos nucleicos virales fueron extraídos con el kit comercial Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, CA, USA) y los ácidos nucleicos fueron detectados mediante un procedimiento estandarizado de un paso de RT-PCR en tiempo real con primers y sondas Taqman específicos para los siguientes virus entéricos: NoV genogrupos I (GI) y II (GII) (da Silva et al., 2007; Svraka et al., 2007; Kageyama et al., 2003; Loisy et al., 2005), HAV (Costafreda et al., 2006), RV (Zeng et al., 2008) y EV (Read y Kurtz, 1999) y FCV (Di Pasquale et al., 2010).

**RT-PCR convencional.** Las muestras positivas se re-amplificaron por RT-PCR convencional con un par de primers dirigidos a la región parcial del genoma que codifica a la proteína de la cápsida VP1 de norovirus, un fragmento situado en el ORF2 (Kojima et al., 2002).

**Secuenciación y análisis filogenético.** El amplicón obtenido mediante la técnica de RT-PCR convencional se purificó y secuenció en ambos sentidos (Macrogen Inc., Seoul, Corea). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit v7.2.5. El alineamiento múltiple de secuencias se realizó utilizando el programa ClustalX implementado en Bioedit. El análisis filogenético se realizó por el método de Neighbor-joining (NJ), utilizando el modelo evolutivo de Kimura-2-Parámetros implementado en MEGA6 (Kumar et al., 2016). El soporte estadístico se realizó mediante el método de remuestreo (bootstrap) con 1000 réplicas. Fue utilizada por lo menos una secuencia de referencia por cada genotipo del genogrupo II de NoV, las cuales se obtuvieron a través de sus números de acceso disponibles en GenBank.

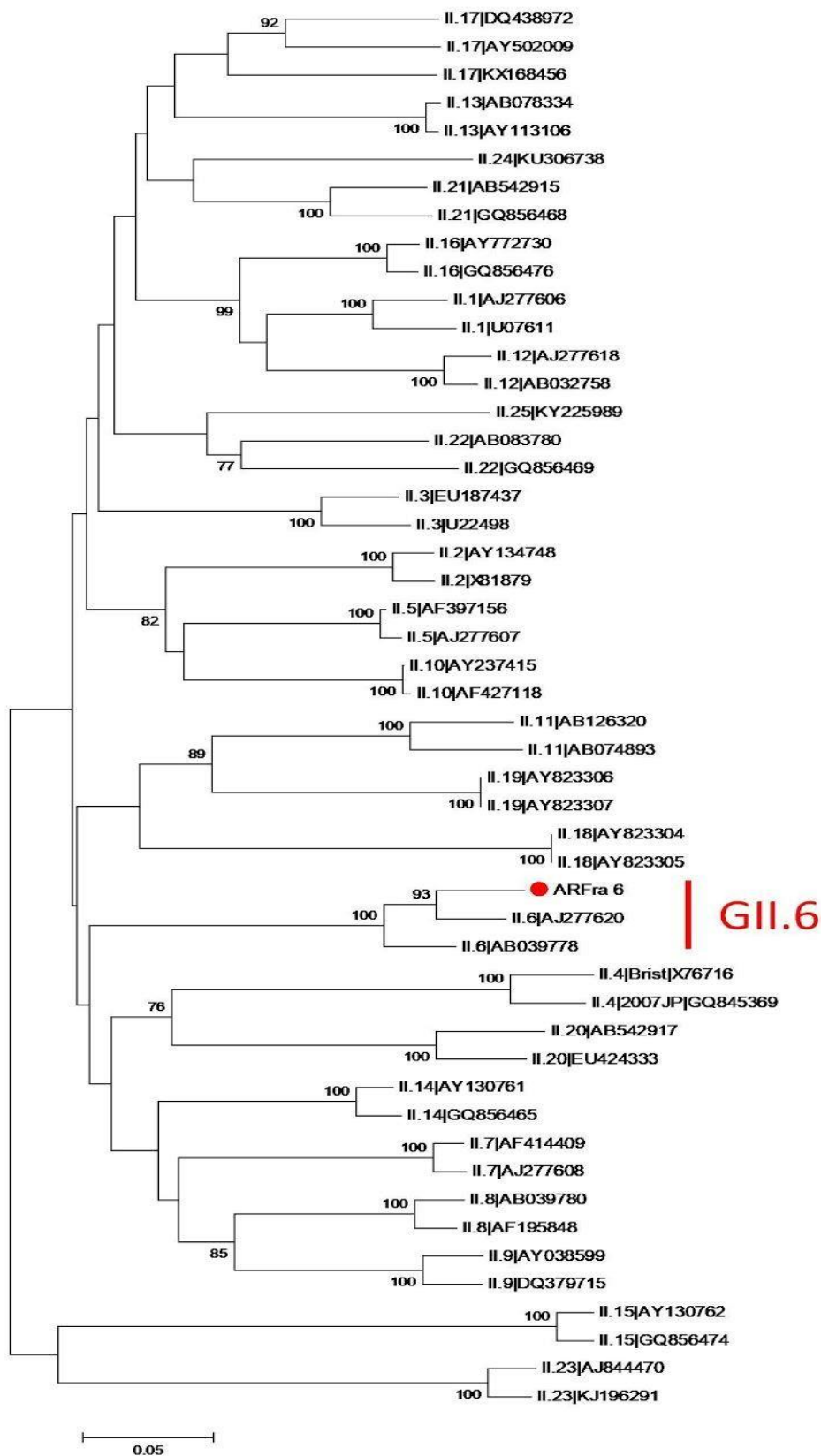
**Detección de enterovirus viable.** Se evaluó la presencia de enterovirus infeccioso (iEV) en las muestras de frutas finas a través del cultivo de los concentrados virales en células CaCo-2. Para esto, los concentrados virales se atemperaron a 37 °C y se trataron con antibióticos (penicilina 100.000 UI/ml, estreptomina 2.5 %) y antimicóticos (amfotericina B 250 µg/ml). Cada muestra se analizó por duplicado en cultivo de células CaCo-2 sembradas en placas de 24-wells. Luego de la inoculación, los cultivos infectados se mantuvieron a 36 °C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % por 4–7 días y diariamente se examinó la presencia de efectos citopáticos (ECP) en las células inoculadas mediante microscopio invertido. Se prepararon extendidos celulares a partir de las células con ECP, como así también de aquellas células que, transcurridos los 7 días de incubación, no revelaron ECP, los cuales se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis por inmunofluorescencia directa con un panel de anticuerpos monoclonales anti-enterovirus.

## RESULTADOS

Se detectó contaminación viral en 1/99 (1 %) de las frutas finas analizadas, correspondiente a una muestra de frambuesa colectada en el mes de abril de 2017, en la que se identificó NoV GII.

No se detectó presencia de NoV GI, HAV, RV, EV ni iEV en las frutas finas comercializadas en Neuquén. Como así tampoco se detectó contaminación por virus entéricos en las demás variedades de frutas finas analizadas (arándanos, frutillas, moras, corintos, grosellas y cassis).

El análisis filogenético de la cepa de NoV detectada en frambuesas reveló que pertenece al genotipo 6 del genogrupo II, con un apoyo de bootstrap igual al 100 % (Figura 1).



**Figura 1.** Árbol filogenético de cepas de NoV GII basado en la secuencia nucleotídica parcial del gen de la cápside. En los nodos se muestran los valores de bootstrap mayores al 70 %. La barra indica la distancia que representa 5 % de divergencia. La cepa de NoV detectada en frambuesas de Argentina se indica con un círculo rojo.

## CONCLUSIONES

En nuestro estudio, las muestras de frutas finas comercializadas en Neuquén resultaron negativas para NoV GI, HAV, RV y EV. Sólo una muestra de frambuesa resultó positiva para NoV GII. Si bien la detección de NoV en frutas finas ha sido reportada previamente (RASFF Portal), este constituye el primer reporte en Argentina. El genotipo viral detectado fue GII.6, es cual ha emergido en frecuencia a nivel mundial en los últimos años, siendo en la actualidad el segundo genotipo más común asociado a brotes de gastroenteritis (Sharma et al., 2019). Los resultados de este trabajo podrían ser de utilidad como base de datos para evaluaciones de riesgo de transmisión de virus entéricos por consumo de frutas finas.

## REFERENCIAS

Beuchat LR. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4:413-423.

Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol.* 72:3846-55.

da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS. 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol.* 73:7891-7.

Di Pasquale S, Paniconi M, De Medici D, Suffredini E, Croci L. 2010. Duplex Real Time PCR for the detection of hepatitis A virus in shellfish using Feline Calicivirus as a process control. *J Virol Methods.* 163:96-100.

Fleet GH, Heiskanen P, Reid I, Buckle KA. 2000. Foodborne viral illness--status in Australia. *Int J Food Microbiol.* 59:127-136. Review.

Food and Agriculture Organization, World Health Organization (FAO/WHO). 2008. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: Meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series* 13.

ISO/TS 15216-2. 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO/TS 15216-1. 2017. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification. International Organization for Standardization, Geneva.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 41:1548-57.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 100(1-2):107-14.

Koopmans M, Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol.* 90(1):23-41.

Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods.* 123:1-7.

Olaimat AN, Holley RA. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol.* 32(1):1-19.

RASFF Portal. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchForm&cleanSearch=1>

Sharma S, Hagbom M, Carlsson B, Nederby Öhd J, Insulander M, Eriksson R, Simonsson



M, Widerström M, Nordgren J. 2019. Secretor Status is Associated with Susceptibility to Disease in a Large GII.6 Norovirus Foodborne Outbreak. *Food Environ Virol.* (en prensa).

Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteyn B, Koopmans M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol.* 45:1389-94.

World Health Organization (WHO). 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Disponible en:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence)

=1

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 153:238-240.

## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO**

- **Capítulo de libro:**

Oteiza JM, Prez VE, Barril PA. Virus como peligros en frutas y hortalizas. *En Microbiología, higiene y ciencia de alimentos.* Ed. Félix Giovanni Ramos Guerrero, Fernando Gilbert Quevedo Ganoza y Benedicta Carmen López Flores. (En proceso de publicación).

- **Trabajos presentados en reuniones científicas:**

Oteiza JM, Soto S, Jaureguiberry MV, Barril PA. Vigilancia de virus entéricos en frutas finas producidas en Argentina. XV Congreso Argentino de Microbiología. 25 – 27 Septiembre 2019. Buenos Aires, Argentina.

Oteiza JM, Soto S, Jaureguiberry MV, Barril PA. Prevalencia de norovirus en frutas finas de Argentina. I Congreso Internacional de Calidad e Inocuidad Alimentaria. 14 – 16 Noviembre 2019. Lima, Perú.

## ABSTRACT

Soft fruits have been implicated as the probable vehicle of infection in multiple outbreaks of norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV). These foods often receive minimal or no processing and are exposed to virus contamination at each stage of production. In an increasingly globalized world, soft fruits have a wide distribution and can give rise to the spread of diseases in distant parts of the world. With the aim of describing the virological quality of the soft fruits that are marketed in Neuquén, Argentina, a total of 99 soft fruits of different varieties were collected during a 2-year period (2016-2017). Viral particles were eluted and concentrated by precipitation with polyethylene glycol (ISO/TS 15216-2). Genome detection of NoV genogroups I (GI) and II (GII), HAV, rotavirus (RV) and enterovirus (EV) was performed by real-time RT-PCR with TaqMan probes. Positive samples were amplified by conventional RT-PCR and the amplicons were purified and sequenced in both directions. Phylogenetic analysis was performed using Neighbor-Joining, an evolutionary model kimura-2-parameters. Likewise, the presence of infective enterovirus (iEV) was analyzed through the inoculation of viral concentrates in CaCo-2 cells and subsequent detection by direct immunofluorescence. Viral contamination was detected in 1/99 (1.0%) of the soft fruits, corresponding to a raspberry sample obtained during the fall of 2017. No presence of enteric viruses was detected in the other varieties of soft fruits tested, neither the presence of NoV GI, HAV, RV, EV or iEV. The data obtained are the first in the country in relation to the detection of enteric viruses in soft fruits and reveal that the prevalence of enteric viruses in these food matrices is low. This information is useful as reference data for a risk assessment of soft fruits as vehicle of foodborne pathogenic viruses.

# PATÓGENOS INTESTINALES EN LA POBLACIÓN CON DIARREA PERSISTENTE. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO PROSPECTIVO DE CONSULTAS AMBULATORIAS EN UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Basualdo Farjat Juan Ángel, Molina Nora Beatriz, Lissarrague Sabina, Bertucci  
Evangelina

Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos. Facultad de  
Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. 60 y 120, s/n. La Plata.  
Buenos Aires, Argentina

## RESUMEN

Las enfermedades diarreicas son una causa relevante de morbimortalidad infantil y constituyen un problema de salud pública sustancial en los países en desarrollo. La diarrea persistente presenta un especial interés en pediatría por las complicaciones a largo plazo, especialmente, en niños menores de 5 años. Este cuadro puede observarse en 3% a 20% de las diarreas infantiles y se ha relacionado con trastornos del crecimiento, carencias nutricionales, menor desarrollo cognitivo, deficiencias de micronutrientes, anemia y mayor susceptibilidad a las infecciones. En Argentina, no se cuenta con registros oficiales de la frecuencia de diarrea persistente ni de los agentes etiológicos involucrados en dicho cuadro clínico. Por lo tanto, el objetivo general del estudio fue determinar la presencia de patógenos intestinales y las manifestaciones clínicas en la población infantil con diarrea persistente que concurren al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante 2016-2017. El estudio fue realizado con una estrategia cuantitativa, mediante la aplicación de un diseño observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal. Los patógenos investigados fueron *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga, *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp., Rotavirus, Adenovirus, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. y Microsporidios. La presente investigación ha demostrado la existencia de cuadros persistentes de diarrea con una frecuencia de 8% en la población estudiada. Asimismo, se ha señalado la presencia de EPEC y *Blastocystis* spp. en niños con dicho cuadro. Este es el primer reporte de diarrea persistente en la población pediátrica que se atiende en el Hospital Debilio Blanco Villegas de Tandil. Los estudios realizados en el marco de este proyecto permitieron caracterizar el perfil demográfico y clínico de la población con diarrea y estimar las frecuencias de infección entérica en cuadros persistentes de diarrea en niños de la ciudad de Tandil.

**Palabras clave:** diarrea persistente, EPEC, *Blastocystis*, Argentina

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas son una causa relevante de morbimortalidad infantil y constituyen un problema de salud pública sustancial en la población pediátrica de los países en desarrollo (1,2). Desde la perspectiva clínica, las diarreas han sido clasificadas

en tres entidades: diarrea acuosa aguda, diarrea disintérica y diarrea persistente (3). Sin embargo, en 2017, las Guías de Práctica Clínica sobre diarreas, publicadas por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) han recomendado la categorización de los cuadros diarreicos según su duración temporal. Las categorías son diarrea aguda (DAG, duración menor a 7 días), diarrea prolongada (DPO, entre 7 y 13 días) y diarrea persistente (DPE, entre 14 y 29 días) (4).

La DAG es una patología frecuente y de alto impacto en la niñez, especialmente en la población menor de 5 años. Diversos autores han reportado la preponderancia de este cuadro en la población pediátrica, respecto a los eventos de mayor duración (1,5,6). Sin embargo, la continuidad del cuadro clínico fue descrita en una proporción variable de los casos (1,7,8).

Los cuadros diarreicos persistentes son de especial interés en pediatría. Los episodios frecuentes de DPE pueden comprometer el estado nutricional y han sido relacionados con trastornos del crecimiento, carencias nutricionales, menor desarrollo cognitivo, deficiencias de micronutrientes, anemia y mayor susceptibilidad a las infecciones (7,9, 10). La persistencia de los síntomas entéricos puede observarse entre 3% y 20% de los cuadros diarreicos (1). Al respecto, siete estudios realizados en niños de Bangladesh, Brasil, Perú, India, Kenia, Etiopía y Zimbawe reportaron valores cercanos a 10% de cuadros diarreicos persistentes en pediatría (1,5,8-10). Por el contrario, autores de Israel y Brasil señalaron que la DPE puede alcanzar valores cercanos a 30% (1,7,11).

La patogenia de la DPE es compleja y no está totalmente esclarecida (12-14). Los agentes etiológicos hallados en población con DPE fueron *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *S. enterica*, *Campylobacter* spp., *G. intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. (1,2,12,14).

En Argentina, no se cuenta con registros oficiales de la frecuencia de agentes infecciosos en la población que cursa cuadros persistentes. Por lo tanto, el objetivo general del estudio fue determinar la presencia de patógenos intestinales y las manifestaciones clínicas en la población infantil con diarrea persistente que concurren al Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas de Tandil durante el período 2016-2017.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño del estudio fue observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal. La población del estudio estuvo constituida por niños de ambos géneros, menores de 16 años, que presentaron un cuadro diarreico y que se atendieron en el Hospital de Niños Debilio Blanco Villegas (HDBV) de Tandil, Argentina.

-*Aspecto macroscópico y microscópico de las heces:* Las heces fueron caracterizadas según forma y consistencia aplicando la Escala de Bristol. La detección de hematíes y leucocitos fecales se realizó mediante observación al microscopio (4).

-*Detección de patógenos bacterianos:* Todas las heces fueron cultivadas en medios selectivos y diferenciales para el desarrollo de *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* O157, *Yersinia* spp. y *Aeromonas* spp. La caracterización fenotípica se realizó mediante el sistema VITEK2 (BioMérieux). Los aislamientos bacterianos se confirmaron mediante técnicas de aglutinación con antisueros (16).

-*Detección de patógenos virales:* Rotavirus y Adenovirus se identificaron con un inmunoensayo cromatográfico (Biomerieux).

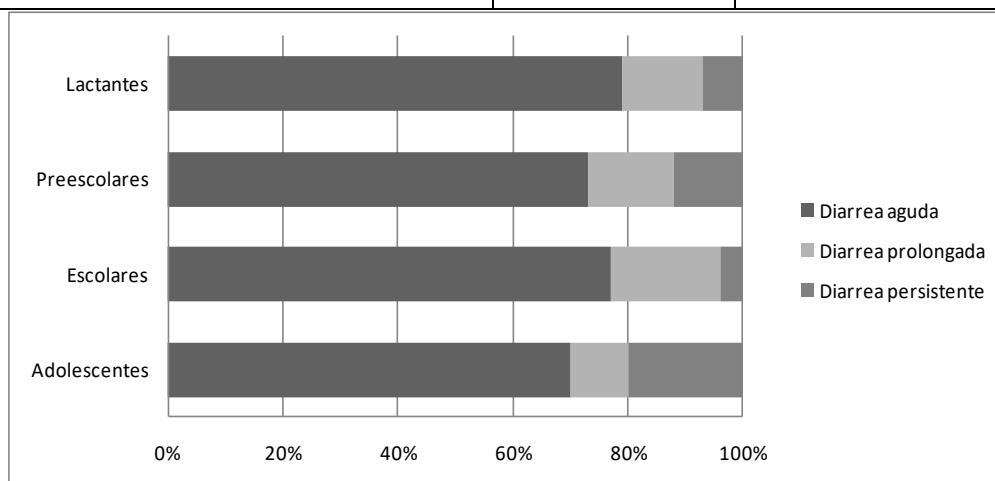
-*Detección de patógenos parasitarios:* Los parásitos intestinales fueron detectados mediante técnicas de concentración y de tinciones permanentes (16).

*-Recolección y procesamiento de la información de los niños con diarrea:* la información demográfica y clínica de los niños se obtuvo de las historias clínicas del HDBV.

## RESULTADOS

El grupo de estudio quedó constituido por 190 niños con diarrea con una edad promedio de 3,5 años y un leve predominio masculino (56%). La mayor frecuencia de casos estuvo representada por la DAG (70% a 79%). Los cuadros de DPO y DPE se presentaron en menor proporción (4% a 20%) (tabla 1, figura 1).

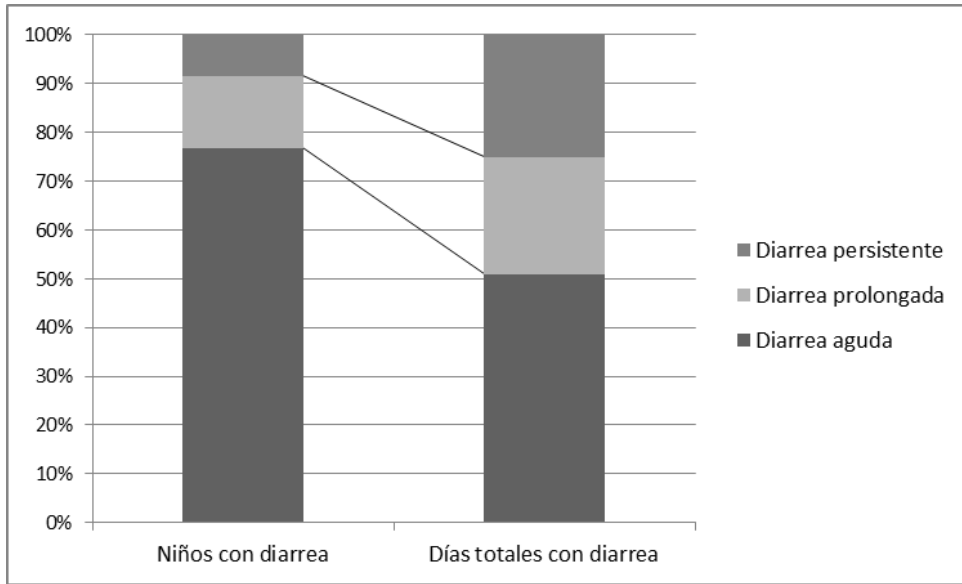
Duración temporal de la diarrea	Frecuencia de casos	
	n	%
Diarrea aguda	146	77
Diarrea prolongada	28	15
Diarrea persistente	16	8
<b>TOTAL</b>	<b>190</b>	<b>100</b>



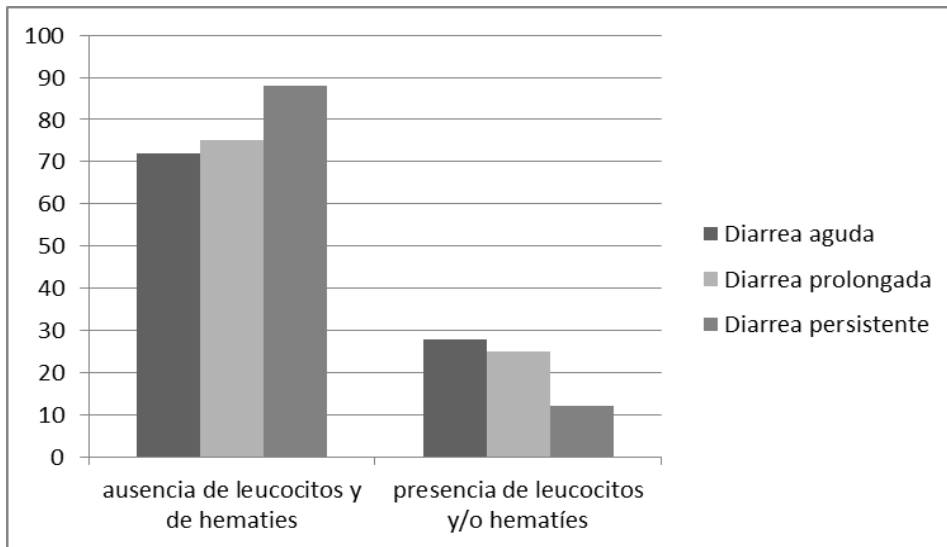
**Figura 1:** frecuencia de diarrea según grupo etario. Tandil, 2016-2017.

El grupo de estudio presentó un total de 1.009 días con diarrea, de los cuales, 522 días (51,7%) pertenecieron a cuadros agudos, 238 días a cuadros prolongados y 249 días a cuadros persistentes (figura 2).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron diarrea y vómitos (36%). La deshidratación fue registrada en 14%, mientras que la presencia de pujo y tenesmo fue reportada en 2% de los casos. Las heces diarreicas (líquidas y pastosas) representaron el 83% de los casos. La presencia de sangre y/o leucocitos fue evidenciada en 26% de los niños (figura 3).



**Figura 2:** Número de niños con diarrea y días totales con diarrea según duración temporal del cuadro.



**Figura 3:** presencia de leucocitos y/o hemátios según la duración de la diarrea.

La frecuencia de infección entérica fue 40,5%. Los agentes etiológicos detectados en los casos de diarrea se indican en la tabla 2.

Tabla 2: Patógenos entéricos detectados en niños con diarrea, según la duración temporal del cuadro, Tandil, 2016-2017			
Patógeno entérico	Diarrea aguda	Diarrea prolongada	Diarrea persistente
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	35 (58,0)	8 (66,6)	4 (80)
<i>Shigella flexneri</i>	7 (11,9)	2 (16,6)	0
<i>Salmonella</i> enterica no tifoidea (SNT)	4 (6,8)	1 (8,4)	0
<i>E. coli</i> O157 (STEC O157:H7)	2 (3,3)	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1 (1,7)	0	0
Rotavirus	1 (1,7)	0	0
<i>Blastocystis</i> spp.	3 (5,0)	0	0
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2 (3,3)	0	0
<i>Giardia intestinalis</i>	2 (3,3)	0	0
Coinfección EPEC / <i>Blastocystis</i> spp.	3 (5,0)	0	1 (20)
Coinfección EPEC / <i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1 (8,4)	0
TOTAL	60 (100)	12 (100)	5 (100)

Diarrea aguda (DAG, menor a 7 días), diarrea prolongada (DPO, 7 a 13 días) y diarrea persistente (DPE, 14 a 29 días).

## DISCUSIÓN

En esta investigación, la mayor frecuencia de casos estuvo representada por la DAG. Este resultado estuvo en concordancia con las frecuencias publicadas en diversos países de Asia, África y Latinoamérica (5,8).

La DPO presentó una frecuencia de 15% en la población con diarrea. Este valor fue coincidente con lo publicado por autores de Brasil (12%) e Israel (25%) (1,17). En este estudio, la frecuencia de DPE fue observada en 8% de los niños con diarrea. De modo similar, estudios realizados en Bangladesh, Brasil, Perú, India, Kenia, Etiopía y Zimbawe reportaron valores cercanos a 10% de cuadros persistentes en pediatría (1,2,5,8,10).

En Tandil, los niños con DPO y DPE representaron el 23% de todos los casos estudiados, sin embargo, contribuyeron con el 48% de los días totales con diarrea. Este hallazgo fue coincidente con lo reportado por diversos autores y destaca la importancia de la detección precoz y tratamiento oportuno de los cuadros de diarrea que continúan más de una semana (1,7,10).

En esta investigación, la presencia de vómitos fue detectada en 36% y la deshidratación fue registrada en 14% de los niños con diarrea. Un estudio de cohorte, realizado en niños de India reportó que los vómitos estuvieron presentes en 10% de los casos (18). Por el contrario, otros investigadores señalaron frecuencias de vómitos entre 50% y 84% (19). Con respecto a la deshidratación durante un cuadro diarreico, los estudios difieren ampliamente, registrando valores entre 1% y 56% de los casos (5,20-23). En resumen, la evidencia señala que las frecuencias de vómitos y deshidratación presentan un amplio rango de valores y se hallan relacionadas con factores como el agente etiológico, la edad del niño, el tipo de alimentación o la estacionalidad, entre otros (4,24).

En esta investigación, la presencia de patógenos entéricos fue observada en 40,5% de los niños con diarrea. Diversos autores han comunicado frecuencias de casos positivos entre 20% y 75% de los casos de diarrea, señalando que la recuperación de patógenos podría variar con el agente etiológico y sus factores de virulencia, el método de detección, el consumo de antimicrobianos, la época del año o la región geográfica (6,23,26-28).

En este estudio, las infecciones entéricas bacterianas fueron prevalentes (87%). Sin embargo, sólo uno de cada cuatro niños presentó leucocitos y hematíes en las heces. Estos resultados son coincidentes con diversas publicaciones que señalaron la baja sensibilidad de dicho parámetro para detectar infecciones entéricas invasivas (4,25).

Las bacterias halladas con mayor frecuencia fueron EPEC, *S. flexneri* y *S. enterica*. El perfil etiológico de las gastroenteritis ha presentado variaciones según la región geográfica. Por ejemplo, en Europa, Estados Unidos, Canadá y Australia, los patógenos más frecuentes fueron EPEC y *S. enterica* (29-31). Por el contrario, en África, Asia y Latinoamérica, los principales patógenos fueron *Shigella* spp. y *S. enterica* (29,32). En Argentina, los reportes oficiales han informado que los agentes bacterianos de diarrea identificados con mayor frecuencia fueron *Shigella* spp., EPEC y *S. enterica*. (2,33,34).

En el presente trabajo, los agentes infecciosos hallados en niños con DPE fueron EPEC y *Blastocystis* spp. En la última década, varios estudios de casos y controles han identificado a EPEC como una causa relevante de DPE en países en desarrollo (35). La importancia de dicho patógeno en cuadros persistentes ha sido señalada en estudios sobre población pediátrica con diarrea de Brasil (36,37). El significado clínico de la infección con *Blastocystis* spp. permanece incierto, sin embargo, la presencia de dicho parásito en población con DPE ha sido reportada en diversos estudios (10,26,38-40).

Este estudio constituye el primer reporte de diarrea persistente en la población pediátrica que se atiende en el HDBV de Tandil. La presente investigación ha demostrado la existencia de cuadros persistentes de diarrea con una frecuencia de 8% y ha señalado la presencia de EPEC y *Blastocystis* spp. en niños con DPE.

Los estudios realizados en el marco de este proyecto permitieron caracterizar el perfil demográfico y clínico de la población con diarrea y estimar las frecuencias de infección entérica en cuadros persistentes de diarrea en niños de la ciudad de Tandil. Estudios futuros que involucren otras regiones geográficas del país serán necesarios para establecer la frecuencia de diarrea persistente y los patógenos entéricos en la población pediátrica de Argentina.

### **Agradecimientos:**

Los autores expresan su más profundo agradecimiento a la Fundación “Alberto J. Roemmers” por el subsidio otorgado que permitió llevar adelante el presente trabajo de investigación.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Moore S, Lima N, Soares A, Oria R, Pinkerton R, Barrett L, et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. *Gastroenterology*. 2010; 139: 1156-64.
2. Ministerio de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia 129, SE 29. 73 p.
3. Ministerio de Salud. Plan de abordaje integral de la enfermedad diarreica aguda. 2º edición. 2015. 98 p.



4. Shane A, Mody R, Crump J, Tarr P, Steiner T, Kotloff K, et al. Infectious Diseases Society of America. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2017; 65: 45-80.
5. Islam S, Ahmed T, Mahfuz M, Mostafa I, Alam M, Saeed K, et al. The management of persistent diarrhoea at Dhaka Hospital of the International Centre for Diarrhoeal Disease and Research: a clinical chart review. *Paediatr Int Child Health*. 2018; 38: 87-96.
6. González Corona E. Diarrea aguda, prolongada y persistente en niños y su diferencia de la diarrea crónica. *Rev Med Cuba*. 2017; 21(9): 2047-61.
7. Fagundes-Neto U. Persistent Diarrhea: Still a Serious Public Health Problem in Developing Countries. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013; 15: 345-52.
8. Schilling KA, Omoro R, Derado G, Ayers T, Ochieng JB, Farag TH, et al. Factors Associated with the Duration of Moderate-to-Severe Diarrhea among Children in Rural Western Kenya Enrolled in the Global Enteric Multicenter Study, 2008-2012. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 97: 248-58.
9. Lima A, Moore S, Barboza M, Soares A, Schlepner M, Newman R, et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2000; 181: 1643-51.
10. Bhutta Z. Persistent Diarrhea in Developing Countries. *Ann Nestle*. 2006; 64: 39-48.
11. Lamberti LM, Fischer Walker CL, Black RE. Systematic review of diarrhea duration and severity in children and adults in low- and middle-income countries. *BMC Public Health*. 2012; 12: 276-87.
12. Ochoa T, Salazar-Lindo E, Cleary T. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004; 15(4): 229-36.
13. Guerrant R, Oria R, Moore S, Oria M, Lima A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev*. 2008; 66: 487-505.
14. Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R: Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology*. 2009; 136(6): 1874-86.
15. Degiuseppe JJ. Trends in hospital discharges for intestinal infectious disease in infants in Argentina, 2005-2013. *Arch Argent Pediatr*. 2017; 115(4): 350-6.
16. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods GL, editores. *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color*. 6<sup>o</sup> ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2008.
17. Fraser D, Dagan R, Porat N, el-On J, Alkrinawi S, Deckelbaum RJ, et al. Persistent diarrhea in a cohort of Israeli Bedouin infants: role of enteric pathogens and family and environmental factors. *J Infect Dis*. 1998; 178(4): 1081-8.
18. Bhan M, Bhandari N, Sazawal S, Clemens J, Raj P, Levine M, et al. Descriptive epidemiology of persistent diarrhea among young children in rural northern India. *Bull WHO*. 1989; 67: 281-8.
19. Dutta S, Guin S, Ghosh S, Pazhani G, Rajendran K, Bhattacharya M, et al. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *PLoS One*. 2013; 8(2): 1-5.
20. De T, Kondekar S, Rathi S. Hospital based prospective observational study to audit the prescription practices and outcomes of paediatric patients (6 months to 5 years age group) presenting with acute diarrhea. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10: 1-5.
21. Anvikar A, Dolla C, Dutta S, Rao V, Gadge V, Shukla G, et al. Role of *Escherichia coli* in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2008; 22: 40-6.

22. Alam N, Faruque A, Dewan N, Sarker S, Fuchs G. Characteristics of children hospitalized with severe dehydration and persistent diarrhoea in Bangladesh. *J Health Popul Nutr.* 2001; 19: 18-24.
23. Chung N, Wang SM, Shen CF, Kuo FC, Ho TS, Hsiung CA, et al. Clinical and epidemiological characteristics in hospitalized young children with acute gastroenteritis in southern Taiwan: According to major pathogens. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017; 50: 915-22.
24. Brandt K, Antunes M, Alves Pontes G. Acute diarrhea: evidence-based management. *J Pediatr.* 2015; 91: 36-43.
25. Carreazo N, Ugarte K, Huicho L. Leucocitos Fecales en Niños con Diarrea Aguda: ¿Momento de Reconsiderar la Utilidad Clínica de la Prueba? *Rev Gastroenterol Perú.* 2011; 31: 216-23.
26. Fletcher S, McLaws M, Ellis J. Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: systematic review and meta-analysis. *J Public Health Res.* 2013; 2(1): 42-53.
27. Hebbelstrup B, Olsen K, Struve C, Krogh K, Petersen A. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(3): 614-30.
28. Tian L, Zhu X, Chen Z, Liu W, Li S, Yu W, et al. Characteristics of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in children under 5 years of age: a hospital-based cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2016; 16: 253-61.
29. Bruzzese E, Giannattasio A, Guarino A. Antibiotic treatment of acute gastroenteritis in children. *F1000 Res.* 2018; 7: 193-203.
30. Nguyen R, Taylor L, Tauschek M, Robins-Browne R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(4): 597-603.
31. Slinger R, Lau K, Slinger M, Moldovan I, Chan F. Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (efa1/lifa) gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017; 16: 16-22.
32. Chiyangi H, Muma J, Malama S, Manyahi J, Abade A, Kwenda G, et al. Identification and antimicrobial resistance patterns of bacterial enteropathogens from children aged 0-59 months at the University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia: a prospective cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2017; 17(1): 117-26.
33. Balbachan S, Merino L, Merino D, Balbachan M, Miranda O. Resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de diarreas en niños de Corrientes, Argentina. *Rev Cubana Med Trop.* 2007; 59(3): 213-7.
34. Molina NB, Oderiz S, Bertucci E, Vescina C, Vila Roza V, Cordoba M, et al. Detección molecular de *Escherichia coli* diarregénica en niños con diarrea. VIII Congreso SADEBAC. Buenos Aires. 2018.
35. Donnenberg M, Finlay B. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. *Trends Microbiol.* 2013; 21(7): 317-9.
36. Fagundes-Neto U, Gandolfi L, Scaletsky I. Acute diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli*: Epidemiological and clinical features in Brasilia, Brazil. *Int J Infect Dis.* 1995; 1(2): 65-9.
37. de Andrade JA, Fagundes-Neto U. Persistent diarrhea: still an important challenge for the pediatrician. *J Pediatr.* 2011; 87(3): 199-205.
38. Seguí R, Klisiowicz D, Oishi C, Toledo R, Esteban J, Muñoz-Antoli C. Intestinal symptoms and *Blastocystis* load in schoolchildren of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2017; 59: 86-9.

39. Kermani NA, Jafari F, Mojarad H, Hoseinkhan N, Zali MR. Prevalence and associated factors of persistent diarrhoea in Iranian children admitted to a paediatric hospital. *East Mediterr Health J.* 2008; 16(8): 830-6.
40. Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengård B, Hedlund KO, Kärnell A, et al. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2000; 30(5): 770-8.

## ABSTRACT

Diarrheal diseases are a relevant cause of infant morbimortality and constitute a substantial public health problem in developing countries. Persistent diarrhea presents a special interest in pediatrics due to long-term complications, especially in children under 5 years. This clinical picture can be observed in 3% to 20% of childhood diarrhea and has been related to growth disorders, nutritional deficiencies, impaired cognitive development, micronutrient deficiencies, anemia and greater susceptibility to infections. In Argentina, there are no official records of the frequency of persistent diarrhea or the pathogens involved in this clinical picture. Therefore, the general objective of the study was to determine the presence of intestinal pathogens and clinical manifestations in children with persistent diarrhea attending at Debilio Blanco Villegas de Tandil Children's Hospital during the 2016-2017. The study was carried out with a quantitative strategy, through the application of an observational, descriptive, prospective and cross-sectional design. The pathogens investigated were *Shigella* spp., *Salmonella* spp., Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli*, *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp., Rotavirus, Adenovirus, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* spp. and Microsporidia. The present investigation has demonstrated the existence of persistent diarrhea in 8% of the population studied. The frequency of enteric pathogens in children with persistent diarrhea was 31%. Also, this study has indicated the presence of EPEC and *Blastocystis* spp. in these children. This is the first report of persistent diarrhea in the pediatric population attending at Debilio Blanco Villegas de Tandil Children's Hospital. The studies carried out in the framework of this project allowed to estimate the frequencies of enteric infection in persistent diarrhea in children. Future studies involving other geographic regions of the country will be necessary to establish the frequency of persistent diarrhea and enteric pathogens in the pediatric population of Argentina.

Keywords: persistent diarrhea, EPEC, Blastocystis, Argentina

# EMPLEO DE REGULADORES DE CALCIO INTRACELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFERTILIDAD DE PACIENTES ASTENOZOOSPÉRMICOS CON MENORES NIVELES DE LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA CRISP2.

Nicolas Gastón Brukman

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) CONICET

**Nota:** La mayor parte de los resultados que se informan aquí fueron publicados en el siguiente artículo:

*Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca<sup>2+</sup> entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation.* **Nicolás Gastón Brukman, Sol Yanel Nuñez, Lis del Carmen Puga Molina, Mariano Gabriel Buffone, Alberto Darszon, Patricia Sara Cuasnicu. Vanina Gabriela Da Ros.** J Cell Physiol. 2019 Apr;234(4):5276-5288.

El apoyo de la fundación Alberto J. Roemmers se encuentra mencionada en la sección de agradecimientos (*acknowledgements*) de dicha publicación.

## Introducción

Aproximadamente un 10-15 % de las parejas en edad reproductiva presentan problemas de fertilidad y alrededor de la mitad de los casos se deben a factores masculinos. Sin embargo, las bases genéticas de la infertilidad masculina son mayormente desconocidas. Existen estudios que señalan al gen codificante para la proteína testicular CRISP2 (*Cysteine-rich secretory protein 2*) como uno de los posibles causantes de la infertilidad. En este sentido, existen evidencias de asociaciones entre infertilidad masculina y translocaciones o rupturas en la región cromosómica donde se localiza el gen *Crisp2* en tres hermanos como así también en otros tres hombres en forma independiente (Paoloni-Giacobino et al., 2000; Olesen et al., 2001). Más aún, se hallaron menores niveles de la proteína CRISP2 en pacientes infértiles con azoospermia u oligoastenozoospermia (Du et al., 2006) o con astenozoospermia (Jing et al., 2011). Un trabajo más reciente mostró que una disminución en la expresión de CRISP2 correlacionaba con baja motilidad y mala morfología espermática e infertilidad (Zhou et al., 2015). Pese a la relevancia de CRISP2 para la fertilidad, es escaso aún el conocimiento que se tiene sobre su rol funcional. Estudios realizados por nuestro grupo apoyan la participación de CRISP2 humana y de roedores en el proceso de fertilización, más específicamente en la fusión de gametas (Busso et al., 2005; 2007; Da Ros et al., 2008; Weigel Muñoz et al., 2012; Brukman et al., 2016). Por otro lado, se ha propuesto que CRISP2 participaría en la fisiología espermática por medio de su capacidad de regular canales de calcio (Gibbs et al., 2006). En un trabajo publicado este año por nuestro grupo (Brukman et al., 2016) se desarrolló una colonia de ratones *knockout* para CRISP2 y se

caracterizó su fenotipo reproductivo. Los machos *knockout* presentaron defectos asociados a fertilidad y sus espermatozoides mostraron una menor capacidad fertilizante tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos resultados no solo apoyaron la participación de CRISP2 en la etapa de fusión de gametas sino que además revelaron un rol de la proteína en la regulación de la motilidad ya que los espermatozoides deficientes en CRISP2 presentaron menores niveles de hiperactividad, un tipo de motilidad necesaria para penetrar las envolturas que rodean al ovocito. Dado que la señalización por calcio es clave para el desarrollo de la hiperactividad (Ren et al., 2001; Schuh et al., 2004), se analizaron los niveles intracelulares de este ion mediante ensayos de citometría de flujo. Estos estudios revelaron que los espermatozoides *knockout* para CRISP2 acumulaban mayores niveles de calcio citosólico que los controles luego de la capacitación, proceso fisiológico que permite al espermatozoide fertilizar al ovocito (Brukman et al, 2016).

En base a lo descripto, nos planteamos como objetivo estudiar los la relación entre los niveles el calcio intracelular en espermatozoides humanos, la motilidad de los mismos y los niveles de expresión de CRISP2; y en segundo lugar, estudiar reguladores de calcio intracelular que puedan ser empleados en el futuro para el tratamiento de la infertilidad de pacientes astenozoospermicos con menores niveles de la CRISP2.

## **Materiales y Métodos**

### **Obtención de espermatozoides y capacitación**

Los espermatozoides se obtuvieron de muestras de semen de donantes sanos (cuyas características seminales iniciales concordaban con el criterio de normalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) o de pacientes que asistieron a la clínica de reproducción asistida CEGYR. En todos los casos, se solicitó un período de 48 hs de abstinencia sexual previo a la donación de la muestra y la firma del consentimiento informado.

Los espermatozoides fueron seleccionados mediante las técnicas de *swim-up* o centrifugación en gradiente, según cada caso. Para el *swim-up*, luego de la licuefacción, el semen fue colocado en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW, sin Bicarbonato) (Biggers, 1971) e incubado durante 1 h a 37°C y 5 % v/v CO<sub>2</sub> en una estufa con gaseo automático. Los espermatozoides mótils recuperados de la superficie del medio luego de 1 h. Alternativamente, 1 ml de semen fue colocado sobre una capa de 1 ml de 40 % de densidad (PureCeption®) en un tubo cónico de 15 ml y centrifugado a 300 x g por 20 min, recuperándose los espermatozoides del fondo (Tamburrino et al., 2015). En todos los casos, los espermatozoides fueron lavado y diluidos en BWW (conteniendo o no 25 mM de bicarbonato y 0,5 % m/v de BSA) a una concentración final de 0,5-1,0 x 10<sup>7</sup> células/ml e incubados por 6 hs a 37°C, en una atmósfera de 5 % v/v CO<sub>2</sub>.

### **Obtención de extractos proteicos y Western blot**

Los espermatozoides fueron lavados con PBS y resuspendidos en buffer de siembra (Laemli, 1970). En todos los casos las muestras fueron hervidas y centrifugadas a 5000 xg por 5 minutos para la posterior recuperación del sobrenadante. Para la determinación

de la fosforilación de proteínas en tirosina, los sobrenadantes fueron hervidos por segunda vez en presencia de 70 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Para llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de 1,5 mm de espesor al 7,5%-15% m/v según el caso, preparados siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). La corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente. Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por Towbin y colaboradores (Towbin et al., 1979). La transferencia fue realizada en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % v/v metanol, a voltaje constante durante toda la noche (35 V) a 4°C. Previo al *western blot*, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1 % m/v en ácido acético 5% v/v y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua desionizada. Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de *western blot*, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo descremada 2% m/v en PBS 0,1 % v/v Tween 20 (PBS-Tween), seguida de una incubación con anticuerpo primario en PBS-Tween a la correspondiente dilución. Luego de 3 lavados con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas con anti-IgG de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, acoplado a peroxidasa y diluido 1/4000 en PBS-Tween. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente, eliminándose luego el Tween 20 mediante 1 lavado adicional con PBS. Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación por un período de 1 h a temperatura ambiente o 18 hs a 4°C. Por último, las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL *prime* (GE Healthcare) y G:BOXGENI (Syngene, Synoptics) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de las bandas obtenidas en distintos experimentos fue realizada mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH, EEUU).

### **Evaluación del número y la motilidad de los espermatozoides**

La evaluación del semen fue realizada de forma subjetiva según las indicaciones de la OMS (OMS, 2010). Para el análisis objetivo de la motilidad, alícuotas de 10  $\mu$ l de las distintas suspensiones de espermatozoides fueron colocadas entre porta y cubre objetos (22 x 22 mm) para crear una cámara de 20  $\mu$ m de profundidad y examinadas a 37°C utilizando el sistema SCA evolution (Microoptic). (Mortimer, 1998). Se analizaron los diferentes parámetros (VAP, VCL, VSL, LIN, ALH, STR y BCF) de al menos 200 células por muestra distribuidas en 20 campos distintos grabándose 30 imágenes cada 60 Hz para cada medición.

### **Medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

En todos los casos, los espermatozoides humanos y de ratón fueron incubados con 2  $\mu$ M Fluo-4, AM (sonda sensible a Ca<sup>2+</sup>) y 0,05 % v/v ácido plurónico por 30 min y lavados con medio fresco para eliminar el exceso de sonda (Mata-Martinez et al., 2013).

Citometría de flujo: Los espermatozoides cargados con la sonda Fluo-4, AM fueron expuestos a 2,5 mg/ml de yoduro de propidio y la fluorescencia evaluada inmediatamente

por citometría de flujo utilizando un equipo MAQSQuantAnalyzer 10 para humano. Los resultados fueron evaluados utilizando el programa FlowJo v10 (FlowJo LLC, EEUU).

**Microscopía en tiempo real:** Los espermatozoides cargados con Fluo-4, AM fueron fijados por la cabeza sobre cubreobjetos tratados con laminina (1 mg/ml), permitiendo el movimiento del flagelo. Las muestras fueron montadas en una cámara de 500  $\mu$ l (Hard Apparatus, EEUU) y puestos en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 300 microscope (Nikkon Inc). Las imágenes fueron tomadas cada 500 msec usando iQ software (Andor Bioimaging) y analizadas mediante el programa ImageJ. Al final de cada medición se realizó un tratamiento con ionomicina 20  $\mu$ M seguido de otro con  $MnCl_2$  5 mM para obtener la fluorescencia máxima y mínima, respectivamente. La viabilidad de los espermatozoides fue determinada por la motilidad del flagelo y por la capacidad de responder a ionomicina al final de las mediciones.

### **Determinación del pH intracelular y potencial de membrana**

El pH intracelular y el potencial de membrana en espermatozoides fueron evaluados a través de citometría de flujo utilizando las sondas BCECF-AM y DiSC3(5) (Puga Molina et al., 2017). Para tal fin, los espermatozoides fueron expuestos a 0,5  $\mu$ M de BCECF-AM por 10 min, lavados y resuspendidos en medio sin BSA. Antes de la medición, se agregó 50 nM de DiSC3(5) por 3 min a la suspensión de espermatozoides. La fluorescencia de ambas sondas fue evaluada por el equipo de citometría de flujo MAQSQuantAnalyzer 10, analizándose los resultados a través del programa FlowJo v10. Se consideraron células vivas a aquellas con marca positiva para BCECF (Puga Molina et al., 2017).

### **Análisis de la actividad de CatSper**

La determinación de la actividad de CatSper en espermatozoides fue realizada a través de la medición de la depolarización de membrana en respuesta al agregado de EGTA (Torres-Flores et al., 2011, Ernesto et al., 2014). Para ello, el potencial de membrana fue evaluado por citometría de flujo utilizando la sonda DiSC3(5) como se describió en el punto anterior. En este caso, la viabilidad de los espermatozoides fue determinada utilizando 2,5 mg/ml de yoduro de propidio. La fluorescencia fue evaluada por citometría de flujo antes y después de un tratamiento con 3,5 mM de EGTA por 3 min utilizando un equipo BD FACSCanto™ II. Los resultados fueron evaluados utilizando el programa FlowJo v10.

### **Análisis estadístico**

Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Prism 4.0 (GraphPad, EEUU). Los resultados de experimentos con dos grupos experimentales fueron evaluados por la prueba *t* de Student. Para aquellos experimentos que involucraron más de 2 grupos se utilizó la prueba ANOVA de una vía y el post-test de Dunnett para comparar con el control. Para el análisis de las correlaciones se utilizó el análisis de Pearson. En todos los casos la significancia estadística se indica en la leyenda de las figuras y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo.

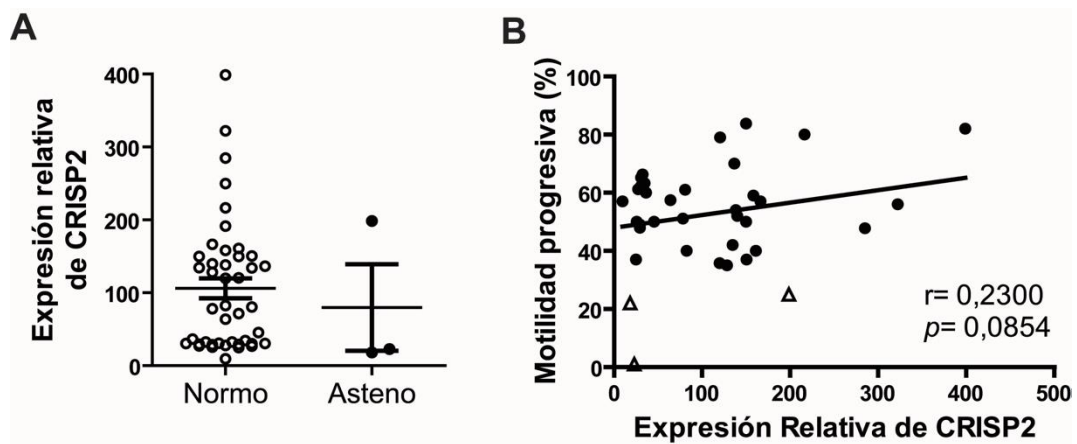


## Resultados

Tal como se mencionara en la introducción, existen estudios que señalan al gen codificante para la proteína testicular CRISP2 como uno de los candidatos cuya alteración es causante de infertilidad masculina, especialmente asociada a astenozoospermia (Paoloni-Giacobino et al., 2000; Olesen et al., 2001; Du et al., 2006; Jing et al., 2011; Zhou et al., 2015). Estos estudios señalan que, además del rol en la fusión de gametas propuesto previamente por nuestro laboratorio (Busso et al., 2005), CRISP2 tendría una relevancia para la motilidad de los espermatozoides humanos y la fertilidad masculina. En base a ello, y teniendo en cuenta los defectos en hiperactividad y en la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  observados en los animales KO para CRISP2, nos planteamos como objetivo estudiar en muestras de pacientes con astenozoospermia si la falta de CRISP2 podría ocasionar la falla en motilidad a través de la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

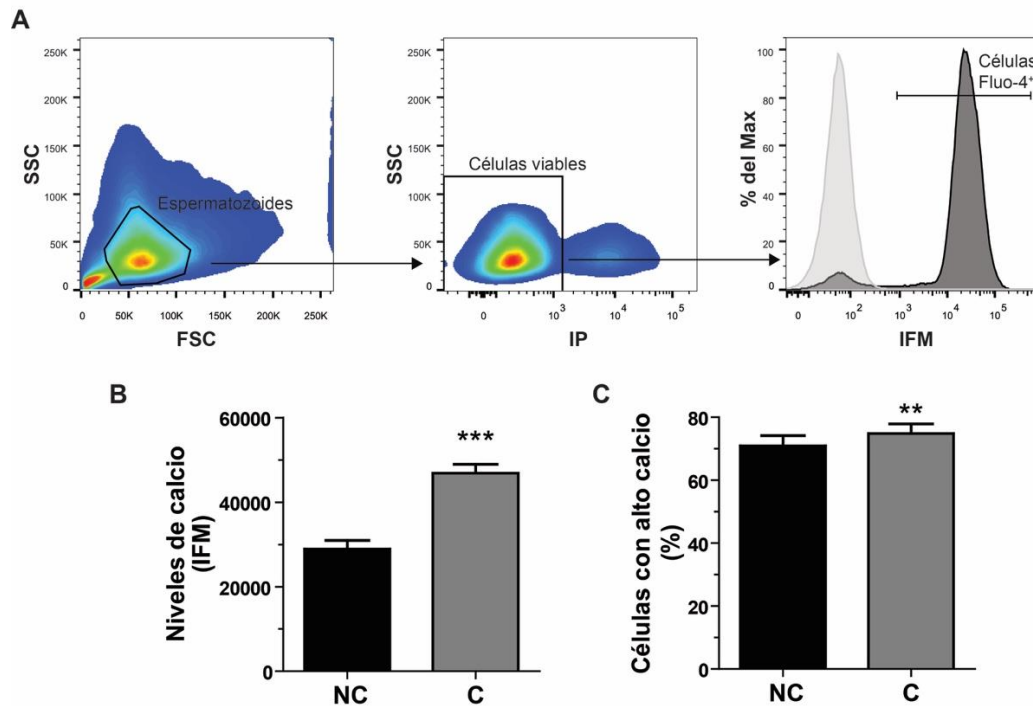
En primer lugar, pusimos a punto el método de recuperación de espermatozoides ya que si intentáramos seleccionar las células por su motilidad en pacientes con problemas severos en la motilidad espermática (por ejemplo, a través de la técnica de *swim up*), las mismas serían tan escasas que serían insuficientes para poder obtener datos y analizarlos estadísticamente. Por lo tanto, se probó el uso de la centrifugación en gradiente de densidad (PureCeption®) de dos capas (40/80 %) y de una única capa (40 %). Los mayores porcentajes de recuperación de espermatozoides se lograron mediante el uso de una única capa de gradiente de densidad, obteniéndose una población de espermatozoides con los mismos porcentajes de motilidad que la muestra de semen original y sin contaminación con células redondas. Dado que trabajos en la literatura muestran que esta forma de separación no selecciona exclusivamente a los espermatozoides con mejor motilidad (Tamburrino et al., 2015), los resultados que se obtienen sobre las células así recuperadas serían representativos de lo que ocurre naturalmente.

Luego de analizarse la motilidad de la muestra de semen se obtuvieron los espermatozoides centrifugación en gradiente de una única capa (PureCeption®, 40 %) ya que de esta forma de separación no selecciona exclusivamente a los espermatozoides con mejor motilidad (Tamburrino et al., 2015). Posteriormente, se dividió cada muestra en dos partes, la primera se utilizó para medir los niveles de expresión de CRISP2 por medio de *western blot*. En el tiempo que duró este estudio, se obtuvieron tan solo 3 muestras astenozoospermicas (motilidad progresiva menor a 32 % según la OMS, 2010) y 43 controles con motilidad normal. De las 3 muestras de pacientes, dos presentaron niveles más bajos de CRISP2 que el promedio de donantes sanos, mientras que solo el 30% de los donantes tenían niveles bajos de CRISP2 (Fig. 1A). Sin embargo, el bajo número de muestras astenozoospermicas y la variabilidad de las muestras controles no permitió hacer una correcta comparación entre ambos grupos, por lo cual se decidió hacer análisis de correlaciones utilizando todas las muestras en conjunto, sin observarse una correlación significativa entre los niveles de CRISP2 y la motilidad progresiva de las muestras (Fig. 1B).



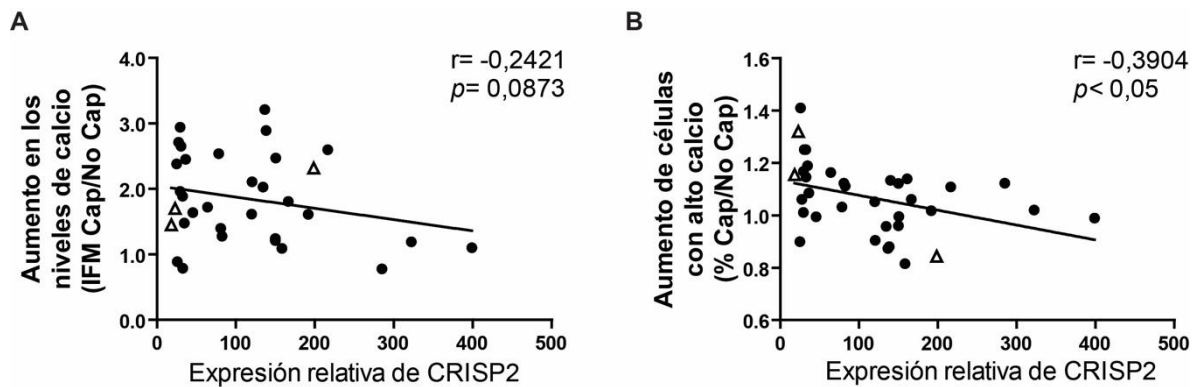
**Figura 1 (A)** Cuantificación mediante *western blot* de la expresión de CRISP2 relativizada a la cantidad de tubulina y a una muestra patrón que se sembró en todos los geles. Se grafican los valores independientes (normozoospermicos,  $n=43$  y astenozoospermicos,  $n=3$ ) y la media  $\pm$  SEM, n.s. **(B)** Porcentaje de motilidad progresiva en función de la expresión relativa de CRISP2. Los triángulos representan las muestras astenozoospermicas y los círculos las de motilidad normal. Se incluye en el gráfico el coeficiente de correlación de Pearson y el nivel de significancia ( $n=37$ ).

Con el objetivo de investigar si CRISP2 tenía un rol en la regulación del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la otra parte de la muestra de espermatozoides se empleó para medir los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por citometría de flujo en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y no capacitantes (sin BSA ni bicarbonato) utilizando una sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  (Fluo-4, AM). En primer lugar, pusimos a punto esta medición con espermatozoides de donantes sanos, siguiendo la estrategia mostrada (Fig. 2A). Los resultados mostraron el aumento esperado de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dependiente de la capacitación, medido como fluorescencia media de Fluo-4 (Fig. 2B) y como el porcentaje de células con alto  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2C), tal como había sido reportado previamente (Mata-Martinez et al., 2013).



**Figura 2** El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides capacitados y no capacitados fue medido por citometría de flujo. **(A)** Estrategia empleada para el análisis de los espermatozoides: los espermatozoides fueron seleccionados en un gráfico del tipo *forward and side scatter plot* (panel a la izquierda) y luego las células negativas para yoduro de propidio (IP) (panel central) fueron utilizadas para determinar la intensidad de fluorescencia media para Fluo-4 (panel derecho). **(B,C)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) del Fluo-4 **(B)** y porcentaje de células con alto  $\text{Ca}^{2+}$  **(C)** de espermatozoides no capacitados y capacitados. Media  $\pm$  SEM,  $n=35$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ .

El próximo paso consistió en evaluar la asociación entre los niveles de CRISP2 y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación. El análisis de los resultados mostró una tendencia, en el caso del aumento de la intensidad de fluorescencia media (Fig. 3A), y una correlación negativa significativa, en el caso del porcentaje de células con alto  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3B), entre el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y la expresión de CRISP2. Estos resultados sugieren que cuanto menor es la expresión de CRISP2 mayor es el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando que los pacientes con expresión aberrante de CRISP2 podrían estar teniendo una desregulación en los niveles de este catión al igual que en el modelo de ratones KO para *Crisp2*.

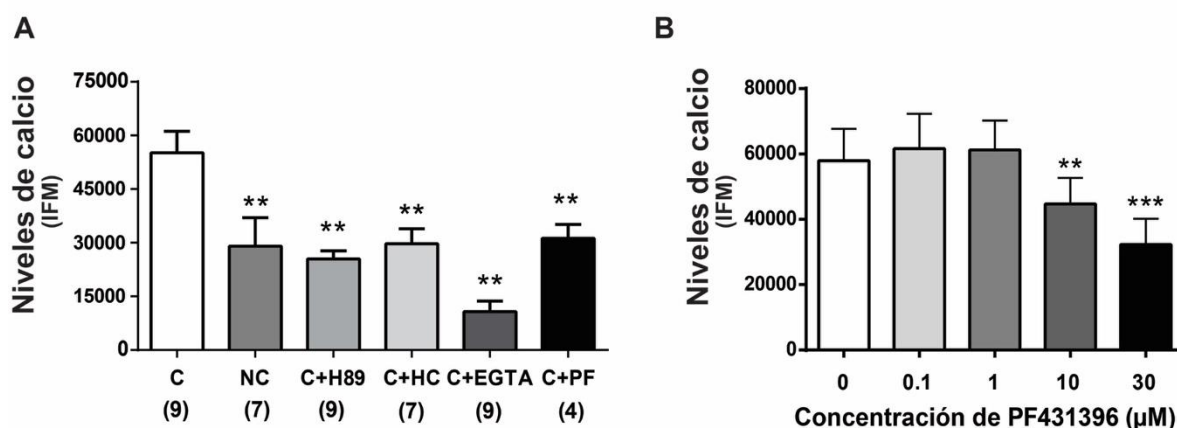


**Figura 3** Aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  medido como veces de aumento de intensidad media de fluorescencia (IFM) (A) o porcentaje de células con alto  $\text{Ca}^{2+}$  (B) entre espermatozoides capacitados (Cap) y no capacitados (No Cap), en función de la expresión relativa de CRISP2. Los triángulos representan las muestras astenozoospermicas y los círculos las de motilidad normal. Se incluye en cada gráfico el coeficiente de correlación de Pearson y el nivel de significancia (n=33).

Dado que nuestros resultados indicaban que bajos niveles de CRISP2 estaban asociados a mayores aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación y teniendo en cuenta los posibles efectos negativos de niveles anormalmente altos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Schuh et al., 2004, Brukman et al., 2016, Li et al., 2016), nos planteamos como objetivo encontrar moduladores de la capacitación que inhiban el aumento anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  y que puedan ser utilizados como herramienta farmacológica para mejorar la motilidad de los espermatozoides de este tipo de pacientes. Como primer paso, se buscaron drogas que inhibieran el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre normalmente durante la capacitación en muestras de donante sanos con la idea de emplear dicha droga en aquellos pacientes que muestren mayores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  que lo normal. Para ello, medimos los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de espermatozoides de donantes sanos expuestos a diferentes compuestos que inhibían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CatSper. Los compuestos empleados fueron EGTA, un quelante de calcio extracelular; HC056456, un inhibidor específico de CatSper; y H89, un inhibidor de la quinasa PKA que regula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al espermatozoide (Torres-Flores et al., 2008, Baron et al., 2016). Finalmente, como un control negativo del H89 se empleó un inhibidor de la quinasa PYK2 (PF431396, PF) que inhibe la fosforilación de proteínas en tirosina (pTyr) sin afectar la actividad de PKA (Battistone et al., 2014). Como controles, se utilizaron espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores y espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes. En todas las condiciones ensayadas se observó una disminución en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular respecto a los espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores (Fig. 4A).

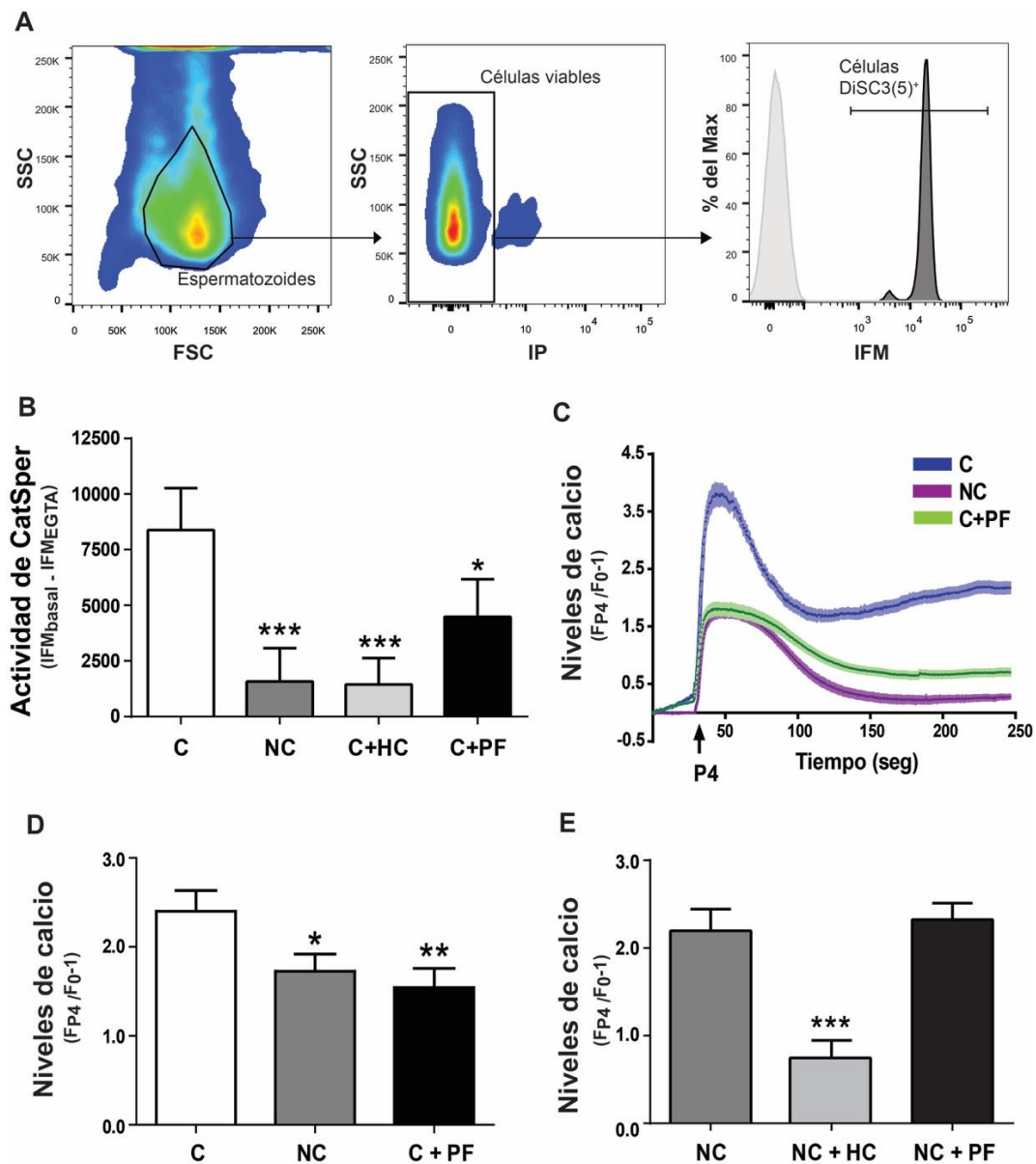
Para nuestra sorpresa, el PF produjo una inhibición en el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que el mismo había sido empleado como control negativo de la inhibición de PKA. Dado que hasta el momento no existían evidencias acerca de la relevancia de la pTyr para la regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , nos pareció de sumo interés investigar en profundidad el *cross-talk* entre esta cascada de señalización y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la capacitación, ampliando así el abanico de actores moleculares que podrían ser blanco de

un tratamiento para la infertilidad. Para ello, en primer lugar estudiamos el efecto de la concentración de PF en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 4B), observándose tanto un efecto dosis-dependiente como diferencias con respecto al control en aquellas concentraciones a las cuales se veía inhibición de la pTyr (Battistone et al., 2014).



**Figura 4 (A)** Niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  expresados como intensidad de fluorescencia media Fluo-4 (IFM) de al menos 4 experimentos diferentes de espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de 3,5 mM EGTA (E); 10  $\mu\text{M}$  de HC056456, inhibidor de CatSper (HC); 50  $\mu\text{M}$  de H89, inhibidor de PKA (H89); o 30  $\mu\text{M}$  de PF431396, inhibidor de PYK2 (PF). Media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  vs. C. **(B)** Niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  medidos por citometría de flujo como intensidad de fluorescencia media (IFM) del Fluo-4 en espermatozoides capacitados expuestos a concentraciones crecientes de PF en el medio. Media  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs 0  $\mu\text{M}$ .

Teniendo en cuenta que CatSper es el principal canal involucrado en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide humano (Smith et al., 2013; Williams et al., 2015), el próximo paso fue estudiar si el efecto de inhibir pTyr en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se debía a una menor actividad de CatSper. En primer lugar, la actividad de CatSper fue evaluada mediante citometría de flujo por depolarización del potencial de membrana ( $E_m$ ) (Torres-Flores et al., 2011, Ernesto et al., 2014), dado que cuando CatSper se encuentra activo en un medio libre de cationes divalentes, es permeable a cationes monovalentes (Kirichok et al., 2006; Strunker et al., 2011) como el  $\text{Na}^+$ , produciendo una depolarización de la célula (Torres-Flores et al., 2011). Para ello, espermatozoides tanto capacitados en presencia de PF como controles (capacitados, no capacitados y capacitados con HC) fueron teñidos con el indicador de  $E_m$  DiSC3(5) y la intensidad de fluorescencia registrada antes y después del agregado de 3,5 mM de EGTA. Solo aquellas células seleccionadas en los gráficos de FSC y SSC, y negativas para yoduro de propidio fueron utilizadas en el análisis (Fig. 5A). Bajo estas condiciones, los espermatozoides capacitados mostraron mayor depolarización de membrana que los espermatozoides no capacitados o capacitados con HC (Fig. 5B), lo cual es consistente con la mayor actividad de CatSper durante la capacitación. En el caso de los espermatozoides capacitados en presencia de PF, se observó una disminución en la depolarización inducida con EGTA comparado con los espermatozoides capacitados control (Fig. 5B).



**Figura 5 (A,B)** Actividad de CatSper evaluada por la depolarización de membrana luego del tratamiento con EGTA. El potencial de membrana fue evaluado por citometría de flujo registrando la fluorescencia de la sonda DiSC3(5). **(A)** Estrategia empleada para el análisis de los espermatozoides: los espermatozoides fueron seleccionados en un gráfico del tipo *forward and side scatter plot* (panel a la izquierda) y luego las células negativas para yoduro de propidio (IP) (panel central) fueron utilizadas para determinar la intensidad de fluorescencia media para DiSC3(5) (panel derecho). **(E)** Espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de 10  $\mu$ M de HC (C+HC) o 30  $\mu$ M de PF (C+PF) expuestos a 3,5 mM EGTA. Los resultados se expresan como la diferencia entre la intensidad de fluorescencia media antes y después del agregado de EGTA ( $\Delta$ IFM<sub>basal-EGTA</sub>). Media  $\pm$  SEM, n=7, \* $p$ <0,05, \*\*\* $p$ <0,001 vs C. **(C-D)** Actividad de CatSper evaluada por el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular inducido por 100 nM de progesterona (P4). **(C)** Experimento representativo de microscopía en tiempo real

de espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de PF (C+PF). Se registró la fluorescencia relativa máxima correspondiente al pico de la respuesta a P4 (**D**). Fluorescencia máxima media del Fluo-4 de espermatozoides no capacitados incubados con vehículo (NC), 20  $\mu\text{M}$  de HC056456 (NC + HC) o 30  $\mu\text{M}$  de PF431396 (NC + PF) (**E**). Los niveles de calcio se representan como la fluorescencia del Fluo-4 relativa al valor inicial (F0). Media  $\pm$  SEM, n=5, \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 vs. C.

Considerando que en humanos, CatSper es activado por progesterona (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), evaluamos si dicha activación era afectada por la inhibición de pTyr. Debido a la rapidez y a la naturaleza bifásica del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 fue registrada por microscopía en tiempo real antes y después del agregado de 100 nM de progesterona. Tal como se muestra en la Figura 5C, se pudo observar el típico aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  bifásico en respuesta a progesterona con un pico máximo a los 50 seg seguido de un *plateau* (Strunker et al., 2011), en todos los tratamientos. Sin embargo, los espermatozoides capacitados en presencia de PF exhibieron una disminución significativa en el pico máximo con respecto a los espermatozoides capacitados control (Fig. 5D).

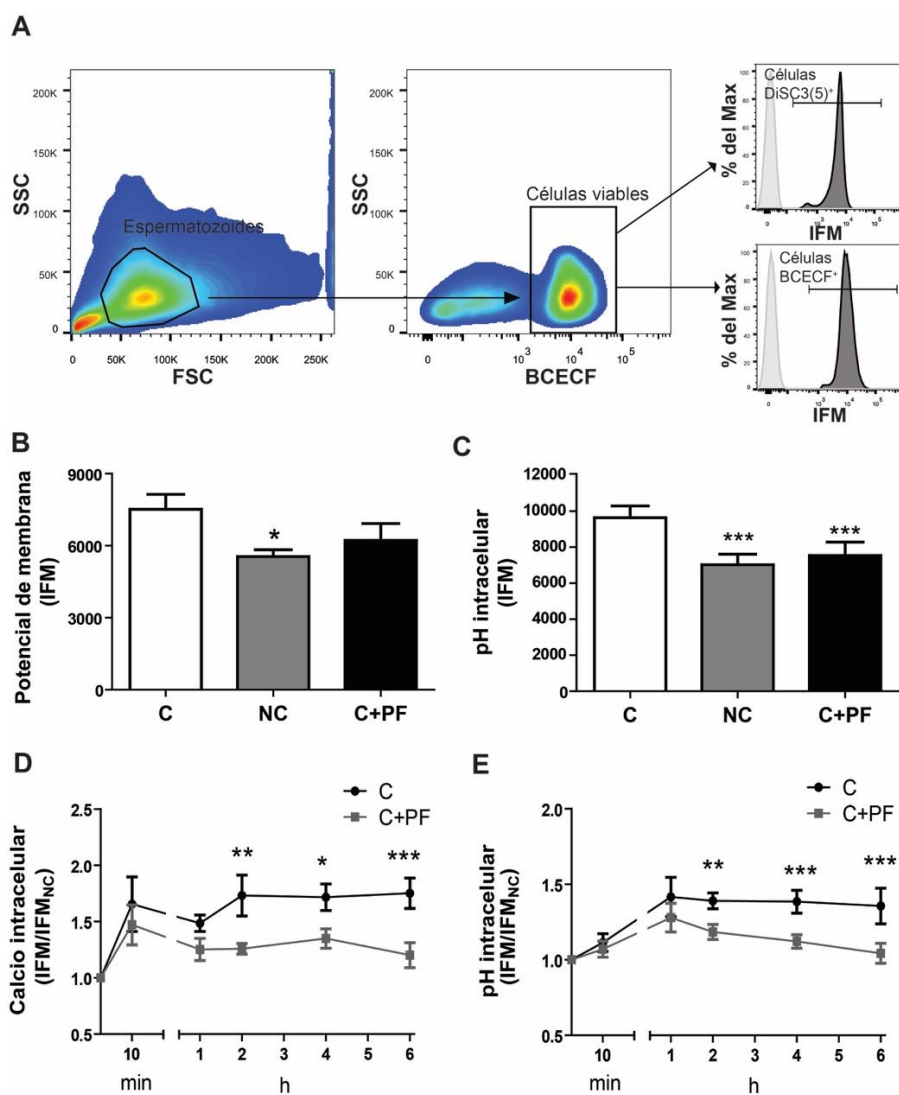
Dado que ambos esquemas experimentales sugerían que la actividad de CatSper estaba disminuida por acción del tratamiento con PF, lo siguiente que nos preguntamos fue si el inhibidor bloqueaba a CatSper directamente o indirectamente a través de un mecanismo asociado a la capacitación tal como la pTyr. Para ello, y considerando que CatSper en espermatozoides no capacitados tiene cierta sensibilidad a progesterona (Ver Fig. 5C) (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), evaluamos si el agregado de PF (o HC como control) a espermatozoides no capacitados inhibía el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la hormona. Los resultados mostraron que en tanto el tratamiento con HC fue capaz de bloquear el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides no capacitados, el agregado de PF a dichas células no afectó la respuesta a progesterona (Fig. 5E), descartando que el PF estuviera bloqueando directamente a CatSper.

Basado en los resultados expuestos, el próximo paso consistió en analizar los eventos asociados a la capacitación que son requeridos para la activación de CatSper y que pudieran estar afectados al inhibir pTyr. En este sentido, es sabido que la actividad de CatSper es dependiente del pH intracelular y del potencial de membrana (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011, Miller et al., 2015), por lo cual el siguiente paso consistió en estudiar la alcalinización del citoplasma y la hiperpolarización de membrana luego de la capacitación. Para evaluar el efecto del tratamiento con PF sobre estos parámetros, los espermatozoides fueron capacitados en presencia del inhibidor y luego analizados por citometría de flujo utilizando como sondas BCECF para pH y DiSC3(5) para Em. Los espermatozoides fueron seleccionados para el posterior análisis tanto por su forma en el gráfico FSC vs SSC como a través de la marca positiva para BCECF (Fig. 6A), dado que esta sonda sólo se acumula en células vivas (Puga Molina et al., 2017). Los resultados mostraron una disminución de la fluorescencia de DiSC3(5) en espermatozoides no capacitados con respecto a los capacitados (Fig. 6B), confirmando la ya descrita ausencia de hiperpolarización en esta condición (López-González et al., 2014). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la fluorescencia de DiSC3(5), entre los espermatozoides expuestos a PF con respecto a los capacitados



control (Fig. 6B). En el caso del pH, se observó una disminución significativa en la fluorescencia tanto en los espermatozoides no capacitados, como ya se encontraba descrito (López-González et al., 2014), como en los capacitados en presencia de PF respecto a los espermatozoides capacitados control (Fig. 6C). Estos resultados indicarían que la vía de pTyr estaría regulando a CatSper a través de la alcalinización del citoplasma.

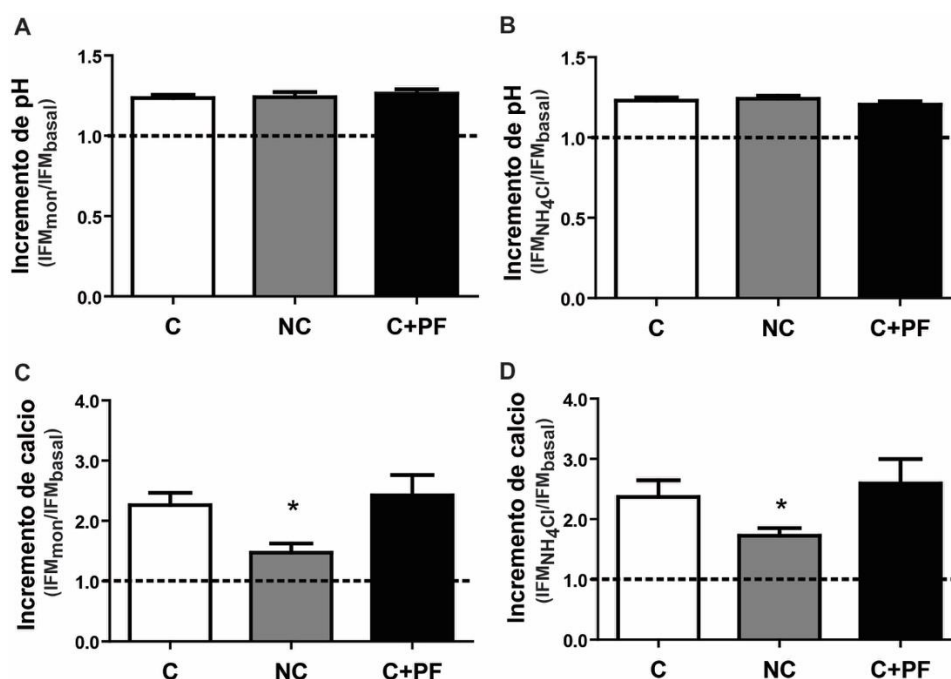
Teniendo en cuenta que la capacitación espermática involucra cascadas de señalización secuenciales y que, en humanos, este proceso requiere varias horas, nos propusimos estudiar la cinética de los cambios en pH y  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides capacitados control o expuestos a PF. Los resultados mostraron que los espermatozoides tratados con PF exhibían un aumento dentro de la primera hora tanto de pH como de  $\text{Ca}^{2+}$ , similar a lo observado en los controles (Fig. 6D,E). Sin embargo, a partir de las 2 hs de capacitación, coincidiendo temporalmente con la activación de la quinasa PYK2, se observaron diferencias significativas en ambos parámetros comparados con el control (Fig. 6D,E).



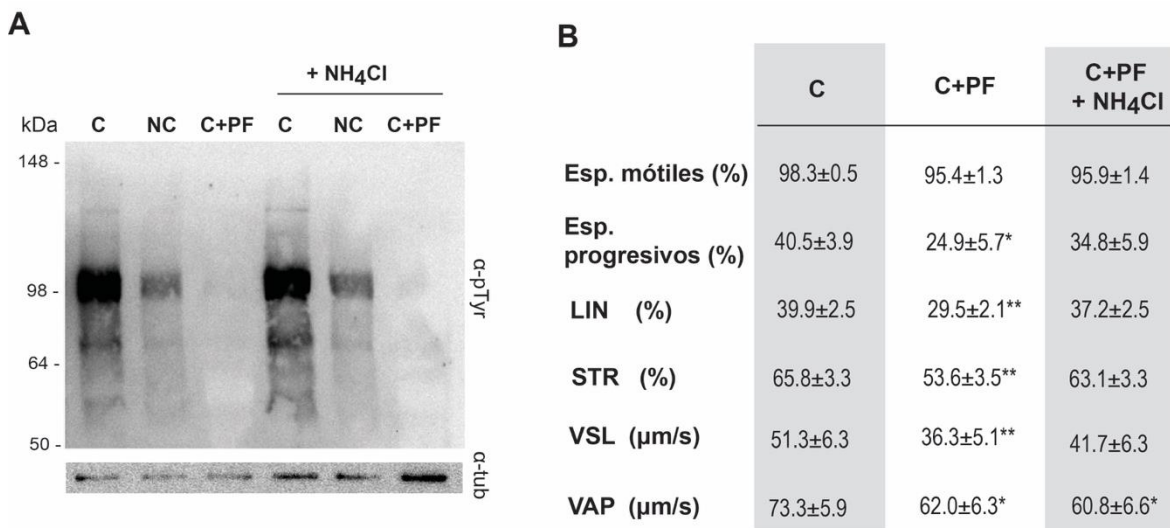


**Figura 6** pH intracelular y Em evaluados por citometría de flujo utilizando las sondas BCECF y DiSC5(3), respectivamente. **(A)** Estrategia empleada para el análisis de los espermatozoides: los espermatozoides fueron seleccionados en un gráfico del tipo *forward and side scatter plot* (panel a la izquierda) y luego las células positivas para BCECF (panel central) fueron utilizadas para determinar la intensidad de fluorescencia media para DiSC3(5) y BCECF (paneles derechos). **(B,C)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) del DiSC5(3) **(B)** y del BCECF **(C)** de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y capacitados en presencia de 30  $\mu$ M de PF (C+PF). Media  $\pm$  SEM, n=8, \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0001 vs C. **(D)**  $Ca^{2+}$  y **(E)** pH intracelulares fueron evaluados por citometría de flujo utilizando las sondas Fluo-4 y BCECF, respectivamente, de espermatozoides capacitados control (C) y capacitados en presencia de 30  $\mu$ M de PF (C+PF). Se muestran los niveles de fluorescencia media relativos al valor de los espermatozoides no capacitados (IFM/IFM<sub>NC</sub>). Media  $\pm$  SEM, n=6, \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0001 vs C.

Como una manera de confirmar que CatSper estaría siendo regulado por pTyr a través de la modulación del pH, espermatozoides capacitados en presencia de PF y los controles (espermatozoides no capacitados y capacitados) fueron expuestos a  $NH_4Cl$  o monensina, dos compuestos con capacidad de elevar el pH intracelular (Alasmari et al., 2013, Woo et al., 2002), evaluándose posteriormente los niveles intracelulares de pH y  $Ca^{2+}$  por citometría de flujo en los espermatozoides antes y después del tratamiento. Los resultados mostraron un aumento similar en el pH intracelular en las tres condiciones empleadas para ambos compuestos (Fig. 7A,C). Sin embargo, mientras que esta alcalinización no logró revertir los niveles de  $Ca^{2+}$  en los espermatozoides no capacitados, en aquellos tratados con PF, fue suficiente para aumentar el  $Ca^{2+}$  intracelular de forma similar a los espermatozoides capacitados control (Fig. 7B,D).



**Figura 7 (A,C)** pH y **(B,D)**  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares evaluados por citometría de flujo utilizando las sondas BCECF y Fluo-4, respectivamente, en espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de PF (C+PF) antes y después de un tratamiento de 2 min con 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A,B) o 5  $\mu\text{M}$  de Monensina (C,D). Los resultados se muestran como las veces de aumento luego del agregado de los compuestos con respecto al basal ( $\text{IFM}_{\text{trat}}/\text{IFM}_{\text{basal}}$ ). Media  $\pm$  SEM, n=5 (Monensina), n=6 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), \* $p < 0,05$ , vs C.



**Figura 8 (A)** Efecto de la alcalinización del citoplasma sobre la motilidad de espermatozoides con inhibición de pTyr. Espermatozoides capacitados en presencia de PF antes y después de ser expuestos a 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fueron analizados por CASA, analizándose luego diferentes parámetros de motilidad. Como control, se utilizaron espermatozoides capacitados en ausencia de PF como control. STR: rectilineidad (%), LIN: linealidad (%), VAP: velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL: velocidad en línea recta desde el inicio al final de la trayectoria ( $\mu\text{m/s}$ ), VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ) y BCF: frecuencia de batido de la cabeza (Hz). Media  $\pm$  SEM, n=6, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **(B)** Efecto de la alcalinización del citoplasma sobre la vía de pTyr. Los niveles de pTyr fueron evaluados en espermatozoides capacitados (C), no capacitados (NC) o capacitados en presencia de PF (C+PF) antes y luego de la exposición por 2 min a 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Para ello, extractos proteicos de los espermatozoides fueron sometidos a electroforesis en gel de acrilamida seguido por *western blot* utilizando un anticuerpo anti-pTyr. Se utilizó tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo. n=3.

Para confirmar que la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por el pH se encontraba río abajo de la pTyr, se evaluaron los niveles de pTyr por medio de *western blot* en los espermatozoides tratados con PF antes y después del aumento del pH por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Los resultados mostraron que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  luego de la alcalinización del citoplasma no involucraría un aumento de pTyr (Fig. 8A). Finalmente, habiendo demostrado la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la modulación del pH, y teniendo en cuenta la ya demostrada relevancia del  $\text{Ca}^{2+}$  y de la pTyr para la motilidad espermática (Battistone et al., 2014), el próximo paso fue analizar si la alcalinización del citoplasma revertía los defectos de motilidad de los espermatozoides tratados con PF. Con este objetivo, espermatozoides capacitados en presencia o no de PF fueron analizados por el sistema CASA antes y después del agregado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , utilizando como control espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor. Los resultados mostraron que la alcalinización farmacológica fue suficiente para revertir, al menos parcialmente, los parámetros de motilidad afectados en los espermatozoides con inhibición de pTyr (STR y LIN) (Fig. 8B), señalando la relevancia del pH en el efecto producido por PF sobre la motilidad.

## Discusión

La proteína CRISP2 está presente en espermatozoides humanos y, al igual que en el ratón, se localiza dentro del acrosoma y la cola de los espermatozoides (Busso et al., 2005, Nimlamool et al., 2013). Asimismo, resultados de nuestro laboratorio indican que CRISP2 humana participaría en el proceso de fusión de gametas (Busso et al., 2005). Tal como se mencionara previamente, existen evidencias que señalan que el gen codificante para CRISP2 estaría asociado a infertilidad masculina, más específicamente en pacientes con astenozoospermia (Paoloni-Giacobino et al., 2000, Olesen et al., 2001, Du et al., 2006, Jing et al., 2011, Zhou et al., 2015), abriendo la posibilidad de que CRISP2 tenga relevancia para la motilidad de los espermatozoides humanos. En base a ello, y considerando que CRISP2 es capaz de regular canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gibbs et al., 2006), nos planteamos como objetivo estudiar en muestras de pacientes con astenozoospermia si la falta de CRISP2 podría ocasionar la falla en motilidad a través de la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Para tal fin, se analizó la motilidad en muestras de semen de pacientes que consultaban por problemas de fertilidad y de donantes sanos, midiéndose en paralelo los niveles proteicos de CRISP2 y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la capacitación. Se pudo observar una clara tendencia hacia la correlación positiva entre la motilidad progresiva de las muestras y los niveles de CRISP2, lo cual sería concordante con los reportes existentes (Jing et al., 2011, Zhou et al., 2015). El próximo paso consistió en correlacionar el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la capacitación con los niveles de CRISP2, observándose que cuanto menor era la expresión de CRISP2, mayor era el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes. Estos resultados están en concordancia con el hecho de que los espermatozoides de ratones KO para CRISP2 tienen un aumento exacerbado de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación. En este sentido, existen varias evidencias que muestran los efectos negativos de un aumento anormal de los niveles de este ion sobre la motilidad espermática (Ho et al., 2002, Schuh et al., 2004, Chang y Suarez, 2011, Aravindan et al., 2012, Tateno et al., 2013, Li et al., 2016,

Brukman et al., 2016). Ante esta posibilidad, nos planteamos como objetivo encontrar moduladores de la capacitación que inhiban el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en humanos y que puedan ser utilizados como posibles agentes terapéuticos para mejorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de pacientes infértiles. Como estrategia, nos propusimos estudiar moduladores del incremento normal de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre durante la capacitación. Los resultados mostraron una inhibición en dicho incremento utilizando el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA y el inhibidor de CatSper HC056456, lo cual es consistente con la relevancia que tiene el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este canal para la capacitación (Ren et al., 2001, Lishko et al., 2011). También se pudo observar un efecto al utilizar el inhibidor de PKA H89, apoyando la idea de que esta quinasa regularía la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a los espermatozoides (Torres-Flores et al., 2008, Baron et al., 2016). Curiosamente, también se observó una disminución en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  al utilizar un inhibidor de la quinasa PYK2 (PF431396, PF), que impide el aumento en pTyr sin afectar la actividad de PKA (Battistone et al., 2014, Alvau et al., 2016). Más aún, la inhibición se produjo a concentraciones a las que el PF inhibe la actividad PYK2 y pTyr en espermatozoides humanos (Battistone et al., 2014), sugiriendo un rol de pTyr en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Dado que el PF no afecta la actividad de PKA (Battistone et al., 2014, Alvau et al., 2016), el efecto observado para el H89 se debería, al menos en parte, a un rol de pTyr. Esto resultó ser de sumo interés ya que no existían en la bibliografía evidencias claras que indicaran la influencia del aumento de pTyr sobre el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación de los espermatozoides, por lo que nos propusimos investigar en profundidad el *cross-talk* entre estas cascadas de señalización.

Tal como se mencionara anteriormente, CatSper es crítico para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a los espermatozoides durante la capacitación (Ren et al., 2001, Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011) y resulta esencial para la fertilidad tanto en ratones (Ren et al., 2001) como en humanos (Smith et al., 2013, Williams et al., 2015). Por lo tanto, ante la posibilidad de que la inhibición con PF pudiera estar regulando a CatSper, estudiamos la actividad de este canal mediante dos aproximaciones diferentes. En primer lugar, evaluamos la depolarización de membrana inducida por EGTA como un indicador de la actividad de CatSper (Torres-Flores et al., 2011, Ernesto et al., 2015). Este ensayo fue validado en nuestras condiciones experimentales al detectarse no solo una mayor actividad del canal en espermatozoides capacitados que en no capacitados (Lishko et al., 2011), sino una completa inhibición de dicha actividad en presencia de HC056456 (Carlson et al., 2009). Empleando este ensayo, nuestros resultados mostraron que el PF era capaz de inhibir la actividad de CatSper. Por otro lado, utilizando como herramienta a la progesterona, que activa a CatSper en humanos (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), pudimos observar que cuando los espermatozoides eran capacitados en presencia de PF, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por progesterona estaba significativamente disminuido, indicando una inhibición de la actividad de CatSper. Considerando que en espermatozoides no capacitados, CatSper es capaz de tener una cierta respuesta a progesterona (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011) no bloqueable por inhibición de pTyr, se puede pensar que la inhibición de CatSper por PF, a diferencia de lo observado con HC056456, no sería directa sobre el canal. En conjunto, estos resultados indicarían que el PF sería capaz de inhibir la actividad de CatSper por un mecanismo subyacente a la capacitación tal como la pTyr.

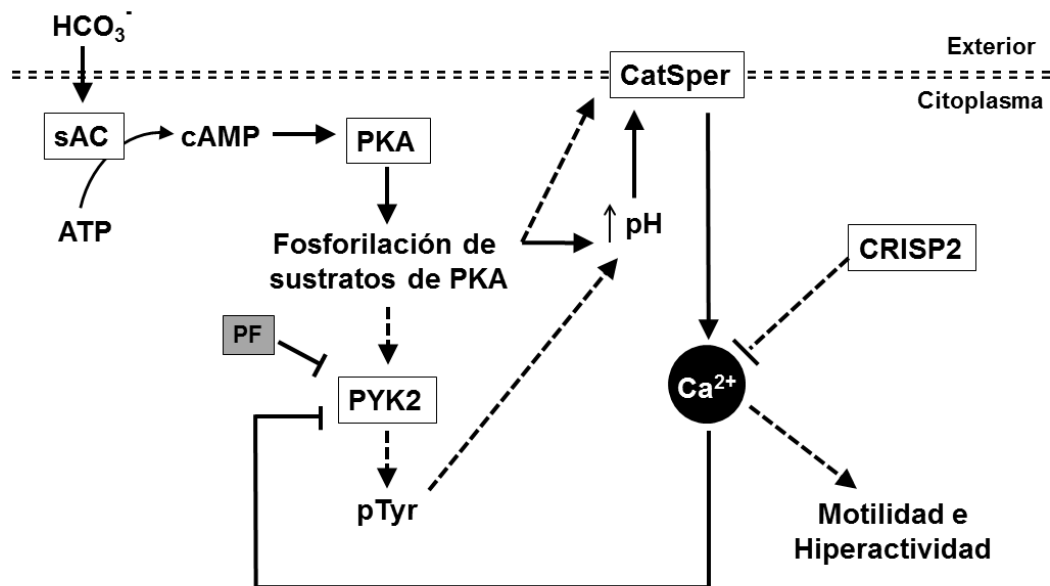
Habiendo encontrando una conexión entre la vía de pTyr y la regulación de CatSper, y considerando que este canal es dependiente del voltaje y activado por pH (Lishko et al., 2011, Strunker et al., 2011), decidimos evaluar el efecto del tratamiento con PF sobre los cambios tanto en el potencial de membrana como en el pH intracelular asociados a la capacitación. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de pTyr por PF durante la capacitación no afectó la hiperpolarización de la membrana del espermatozoide, a diferencia de lo observado para H89 (Puga Molina et al., 2017), indicando que la quinasa PKA tendría un rol en la inducción de la hiperpolarización de membrana que sería independiente de la activación de la vía de pTyr. Sin embargo, el tratamiento con PF bloqueó la alcalinización del citoplasma, sugiriendo que la señalización por pTyr regularía la actividad de CatSper a través de la modulación del pH intracelular. Dado que el mismo efecto había sido reportado para H89 (Puga Molina et al., 2017), es probable que al menos parte del efecto observado al inhibir a PKA se deba al rol de la pTyr en la alcalinización del citoplasma. Es interesante mencionar que si bien las cinéticas revelan un aumento inicial tanto en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  como en el pH durante la capacitación, incluso en presencia de PF, a partir de las 2 hs de capacitación, se empiezan a observar diferencias significativas entre tratamientos. Teniendo en cuenta que el aumento de pTyr no es un evento temprano de la capacitación (Battistone et al., 2013), estos resultados señalan que existiría una activación inicial de CatSper independiente de la señalización por pTyr, la cual podría estar asociada a la activación inmediata de la vía cAMP/PKA de la capacitación de los espermatozoides humanos (Battistone et al., 2013). Este aumento temprano de la actividad de CatSper independiente de la inhibición de pTyr, refuerza la idea de que PF no estaría actuando directamente sobre CatSper, a diferencia de lo que ocurre con otros inhibidores ya que este canal es promiscuo para la acción de múltiples ligandos (Barrat y Publicover, 2012, Brenker et al., 2012). Por otro lado, los menores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH detectados a partir de las 2 hs de incubación en presencia de PF coinciden temporalmente con la activación de PYK2 por auto-fosforilación a lo largo de la capacitación (Battistone et al., 2014), apoyando el rol de la vía de pTyr en el mantenimiento de la actividad de CatSper durante la capacitación.

Basados en estos resultados, quisimos verificar si los menores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  encontrados en los espermatozoides expuestos a PF podrían ser revertidos mediante una alcalinización artificial del citoplasma. Nuestros resultados mostraron que el agregado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o monensina a espermatozoides capacitados en presencia de PF logró aumentar el pH intracelular y fue suficiente para incrementar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Considerando evidencias previas que muestran que el mero aumento de pH no es suficiente para activar a CatSper en humanos (Miller et al., 2015), nuestros resultados sugieren que los espermatozoides expuestos a PF durante la capacitación exhibirían una inhibición del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  por la sola inhibición de pTyr y de sus mediadores río abajo. Por su parte, espermatozoides no capacitados, además de no presentar un aumento de pTyr, exhiben otras fallas tales como la falta de activación de PKA o de hiperpolarización, por lo que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la alcalinización es marcadamente menor. Estos resultados están apoyados por el hecho de que la alcalinización artificial del citoplasma no afecta el estado de la pTyr de la célula, indicando que la inducción de pTyr es previa al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por incremento del pH. En conjunto, estos resultados revelan

un rol para la vía de pTyr en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la modulación de la actividad de CatSper inducida por pH.

Como una forma de investigar el impacto final del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por alcalinización en espermatozoides cuya vía de pTyr se encuentra inhibida, evaluamos la motilidad de espermatozoides expuestos a PF luego de un estímulo con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Si bien fue reportado que el tratamiento con PF afecta la HA (Battistone et al., 2014), se sabe que la sola activación de CatSper por agregado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no tiene efectos sobre este tipo de motilidad (Alasmari et al., 2013), por lo cual nos enfocamos al análisis de los parámetros cinéticos. El tratamiento con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en espermatozoides capacitados en presencia de PF fue capaz de revertir parcialmente los defectos en dos de dichos parámetros (LIN y STR) asociados a la motilidad progresiva indicando que el bloqueo de la alcalinización del citoplasma es causante, al menos en parte, de los defectos en motilidad. Estos resultados son consistentes con que la idea de que pTyr sea un sensor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides humanos, lo cual no había sido reportado hasta el momento para ninguna especie. De este modo, podría proponerse un mecanismo de retroalimentación en el que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  regulen la vía de pTyr (Battistone et al., 2014) y esto a su vez, module la actividad de CatSper, componiendo un sistema de regulación fina que garantice una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular óptima (ver Figura 9). Aunque se requieren mayores estudios para comprender estas diferentes regulaciones, el hecho de que la vía de pTyr regule la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  representa un nuevo mecanismo de regulación de CatSper con el fin de asegurar el éxito de la capacitación.

En conjunto, los resultados de trabajo aportan información acerca de los mecanismos de regulación fina del  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurren durante la capacitación del espermatozoide humano y que le permiten adquirir su capacidad fertilizante. En tanto que CRISP2 estaría previniendo un aumento exacerbado de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , tal como ocurre en el ratón, la vía de pTyr estimularía la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por CatSper a través de la regulación del pH intracelular (Figura 9). Por lo tanto, los defectos en motilidad de aquellos pacientes con deficiencias en CRISP2 podrían deberse a fallas en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que podrían ser normalizados farmacológicamente como estrategia terapéutica.



**Figura 9.** Cascadas de señalización involucradas en el proceso de capacitación. Las líneas de puntos indican regulaciones que pueden involucrar intermediarios.

## Referencias

Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Ramalho-Santos J, Kirkman-Brown J, Michelangeli F, Publicover S, Barratt CL.  $Ca^{2+}$  signals generated by CatSper and  $Ca^{2+}$  stores regulate different behaviors in human sperm. *J Biol Chem.* 2013 Mar 1;288(9):6248-58.

Alvau A, Battistone MA, Gervasi MG, Navarrete FA, Xu X, Sánchez-Cárdenas C, De la Vega-Beltran JL, Da Ros VG, Greer PA, Darszon A, Krapf D, Salicioni AM, Cuasnicu PS, Visconti PE. The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development.* 2016 Jul 1;143(13):2325-33.

Aravindan RG, Fomin VP, Naik UP, Modelski MJ, Naik MU, Galileo DS, Duncan RL, Martin-Deleon PA. CASK interacts with PMCA4b and JAM-A on the mouse sperm flagellum to regulate  $Ca^{2+}$  homeostasis and motility. *J Cell Physiol.* 2012 Aug;227(8):3138-50.

Barón L, Fara K, Zapata-Carmona H, Zuñiga L, Kong M, Signorelli J, Díaz ES, Morales P. Participation of protein kinases and phosphatases in the progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa. *Andrology.* 2016 Nov;4(6):1073-1083.

Barratt CL, Publicover SJ. Sperm are promiscuous and CatSper is to blame.... EMBO J. 2012 Apr 4;31(7):1624-6.

Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. Mol Hum Reprod. 2013 Sep;19(9):570-80.

Battistone MA, Alvau A, Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros VG, Cuasnicú PS. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. Mol Hum Reprod. 2014 Nov;20(11):1054-66.

Biggers JD. Metabolism of mouse embryos. J Reprod Fertil. 1971 Suppl 14, 41-54.

Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB, Strünker T. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. EMBO J. 2012 Apr 4;31(7):1654-65.

Brukman NG, Miyata H, Torres P, Lombardo D, Caramelo JJ, Ikawa M, Da Ros VG, Cuasnicú PS. Fertilization defects in sperm from Cysteine-rich secretory protein 2 (Crisp2) knockout mice: implications for fertility disorders. Mol Hum Reprod. 2016 Apr;22(4):240-51.

Busso D, Cohen DJ, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. Mol Hum Reprod 2005;11:299–305.

Busso D, Goldweic NM, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. Biol Reprod 2007;76:701–708.

Carlson AE, Burnett LA, del Camino D, Quill TA, Hille B, Chong JA, Moran MM, Babcock DF. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. PLoS One. 2009 Aug 31;4(8):e6844.

Chang H, Suarez SS. Two distinct Ca(2+) signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. Biol Reprod. 2011 Aug;85(2):296-305.

Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). Dev Biol. 2008 Aug 1;320(1):12-8.



Du Y, Huang X, Li J, Hu Y, Zhou Z, Sha J. Human testis specific protein 1 expression in human spermatogenesis and involvement in the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril* 2006;85:1852–1854.

Ernesto JI, Weigel Muñoz M, Battistone MA, Vasen G, Martínez-López P, Orta G, Figueiras-Fierro D, De la Vega-Beltran JL, Moreno IA, Guidobaldi HA, Giojalas L, Darszon A, Cohen DJ, Cuasnicú PS. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J Cell Biol*. 2015 Sep 28; 210(7): 1213–1224.

Gibbs GM, Scanlon MJ, Swarbrick J, Curtis S, Gallant E, Dulhunty AF, O'Bryan MK. The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Biol Chem*. 2006 Feb 17;281(7):4156-63.

Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol*. 2002 Oct 1;250(1):208-17.

Jing XW, Xing RW, Zhou QZ, Yu QF, Guo WB, Chen SM, Chu QJ, Feng CQ, Mao XM. Expressions of cysteine-rich secretory protein 2 in asthenospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011;17:203–207.

Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):737-40.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.

Li X, Wang L, Li Y, Zhao N, Zhen L, Fu J, Yang Q. Calcium regulates motility and protein phosphorylation by changing cAMP and ATP concentrations in boar sperm in vitro. *Anim Reprod Sci*. 2016 Sep;172:39-51.

Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*. 2011 Mar 17;471(7338):387-91.

López-González I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López A, Santi CM, Darszon A, Treviño CL. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod*. 2014 Jul;20(7):619-29.

Mata-Martínez E, José O, Torres-Rodríguez P, Solís-López A, Sánchez-Tusie AA, Sánchez-Guevara Y, Treviño MB, Treviño CL. Measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> changes in human sperm using four techniques: conventional fluorometry, stopped flow fluorometry, flow cytometry and single cell imaging. *J Vis Exp*. 2013 May 24;(75):e50344.

Miller MR, Mansell SA, Meyers SA, Lishko PV. Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium*. 2015 Jul;58(1):105-13.

Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13:2139–46.

Nimlamool W, Bean BS, Lowe-Krentz LJ. Human sperm CRISP2 is released from the acrosome during the acrosome reaction and re-associates at the equatorial segment. *Mol Reprod Dev* 2013;80:488–502.

Olesen C, Hansen C, Bendtsen E, Byskov AG, Schwinger E, Lopez-Pajares I, Jensen PK, Kristoffersson U, Schubert R, Van Assche E, Wahlstroem J, Lespinasse J, Tommerup N. Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Mol Hum Reprod.* 2001 Jan;7(1):11-20.

Organización Mundial de la Salud. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn. Geneva, Switzerland:World Health Organization Press. 2010.

Paoloni-Giacobino A, Kern I, Rumpler Y, Djelati R, Morris MA, Dahoun SP. Familial t(6;21)(p21.1;p13) translocation associated with male-only sterility. *Clin Genet.* 2000 Oct;58(4):324-8.

Puga Molina LC, Pinto NA, Torres Rodríguez P, Romarowski A, Vicens Sanchez A, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL, Buffone MG. Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J Cell Physiol.* 2017 Jun;232(6):1404-1414.

Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001 Oct 11;413(6856):603-9.

Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobloch KP, Neyses L. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28220-6.

Smith JF, Syrityna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca<sup>2+</sup> channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 23;110(17):6823-8.

Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. *Nature.* 2011 Mar 17;471(7338):382-6.

Tamburrino L, Marchiani S, Vicini E, Muciaccia B, Cambi M, Pellegrini S, Forti G, Murtatori M, Baldi E. Quantification of CatSper1 expression in human spermatozoa and relation to functional parameters. *Hum Reprod.* 2015 Jul;30(7):1532-44.

Tateno H, Krapf D, Hino T, Sánchez-Cárdenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE. Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 12;110(46):18543-8.

Torres-Flores V, Hernández-Rueda YL, Neri-Vidaurre Pdel C, Jiménez-Trejo F, Calderón-Salinas V, Molina-Guarneros JA, González-Martínez MT. Activation of protein kinase A stimulates the progesterone-induced calcium influx in human sperm exposed to the phosphodiesterase inhibitor papaverine. *J Androl*. 2008 Sep-Oct;29(5):549-57.

Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Hernández-Rueda Y, Darszon A, González-Martínez MT. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2626-35.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Weigel Muñoz M, Ernesto JI, Bluguermann C, Busso D, Battistone MA, Cohen DJ, Cuasnicú PS. Evaluation of testicular sperm CRISP2 as a potential target for contraception. *J Androl*. 2012 Nov-Dec;33(6):1360-70.

Williams HL, Mansell S, Alasmari W, Brown SG, Wilson SM, Sutton KA, Miller MR, Lishko PV, Barratt CL, Publicover SJ, Martins da Silva S. Specific loss of CatSper function is sufficient to compromise fertilizing capacity of human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2015 Dec;30(12):2737-46.

Woo AL, James PF, Lingrel JB. Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in sperm motility. *Mol Reprod Dev*. 2002 Jul;62(3):348-56.

Zhou J, Zhou Q, Lyu X, Zhu T, Chen Z, Chen M, Xia H, Wang C, Qi T, Li X, Liu CD6. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biol Reprod* 2015;92:28.1–9.

## **Abstract**

The Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP1-4) are expressed in the male reproductive tract of mammals and participate in the fertilization process. In particular, the protein CRISP2 is present in mature and has a role in fertilization in humans and rodents. Furthermore, the altered expression of CRISP2 in humans is associated with sperm motility defects (asthenozoospermia) and male infertility. Previous studies showed that mouse sperm lacking CRISP2 present lower levels of a vigorous motility required for penetration of the egg coats, as well as a dysregulation in intracellular calcium levels associated with capacitation, suggesting the fertilization defects as a mechanism underlying infertility in men with aberrant expression of CRISP2.

Based on this, we aimed to study if the lower levels of CRISP2 found in patients with sperm motility defects were associated with abnormal calcium levels. The results showed a negative association between the calcium increase during capacitation and the expression of CRISP2 suggesting that, as in mice, this protein has a role in the regulation of calcium levels in human sperm. Therefore, this could be the link between CRISP2 aberrant expression and sperm motility.

Lately, with the objective of finding therapeutic strategies for the modulation of calcium levels in defective sperm, we studied the regulation of calcium during human sperm capacitation. We observed that calcium entry through CatSper could be prevented by inhibiting the tyrosine phosphorylation of proteins that occurs during capacitation. This effect was associated with a lower alkalization of the cytoplasm, that is required for the complete activation of CatSper. These results suggest a new role for the tyrosine phosphorylation pathway in the modulation of calcium in sperm and the modulation of this signaling cascade could be used as a therapeutic strategy in sperm with altered levels of calcium from infertile patients, possibly like those with alterations in CRISP2 levels.

# EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES* SPP. EN ARGENTINA

María Emilia Cattana

Instituto de Medicina Regional – Universidad Nacional del Nordeste

## INTRODUCCION

La paracoccidioidomicosis (PCM) es una micosis sistémica endémica en Latinoamérica, que se da principalmente en Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y Argentina (1–3). La infección está producida por los hongos termodimorfos del género *Paracoccidioides*. En Argentina, la PCM es la micosis endémica más frecuente en pacientes inmunocompetentes con enfermedad progresiva (4,5), y se distribuye en dos áreas endémicas bien definidas. Una de ellas se encuentra en la región noroeste (NOA) del país, e incluye la región subtropical de la Yunga de las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán, donde si bien no existen datos actualizados, se reportó hasta el 40% de formas agudas de la enfermedad (4,5). El área endémica de mayor extensión se encuentra en la región noreste (NEA) y presenta la tasa de incidencia más alta de la enfermedad (4–8).

Recientemente, mediante herramientas moleculares, fueron definidas 5 especies para el género *Paracoccidioides*: *P. lutzii*, *P. brasiliensis* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) y *P. venezuelensis* (PS4) (9–13). Además, del trabajo de secuenciación de genoma completo de *P. brasiliensis* realizado por Muñoz y col. en 2016, pudieron diferenciar dos linajes dentro de esta especie, S1a y S1b. Para conocer el impacto de esta diversidad es necesario secuenciar una mayor cantidad de aislamientos y de fuentes ambientales como clínicas.

El objetivo de este estudio fue describir aspectos epidemiológicos clínicos y moleculares de los casos de PCM de Argentina, y analizar el origen geográfico de los aislamientos y comparar su perfil genético con especies de *Paracoccidioides* que circulan en otros países.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Aislamientos estudiados, extracción y secuenciación de ADN.**

Se estudiaron 31 aislamientos de *Paracoccidioides* de Argentina (14), Paraguay (5), Venezuela (7), Brasil (1), Bolivia (1) y Perú (1). También se analizaron 2 aislamientos de los cuáles se desconocen sus orígenes. Las cepas de *Paracoccidioides* sp. en su fase levaduriforme se mantuvieron en medio Fava-Netto semisólido y se almacenaron a 4 ° C. Para la extracción de ADN, los aislamientos se subcultivaron a 35° C en medio Fava-Netto y se utilizaron colonias de levadura que no tenían más de seis días. Las células de levadura se recogieron utilizando un ansa y se transfirieron aproximadamente 500 mg de células a un tubo que contenía 300 µl de tampón TES (Tris-HCl 0,1 M a pH 8; EDTA 10 mM; SDS al 2%) y perlas de vidrio de 0,5 mm; las células se rompieron usando agitación intensa (vórtex). Se añadieron cinco µl de proteinasa K (20 mg / ml) y las muestras se calentaron a 55° C durante una hora. Se añadieron 500 µl de solución CTAB al 2% (NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM; 2-mercaptoetanol al 0,2%; CTAB al 5%) y se

incubaron a 65° C durante una hora. El ADN se purificó utilizando el método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se precipitó con etanol frío al 100%. Se añadió RNAsa (10 µg / ml) y se incubó a 37° C durante 30 minutos. El ADN de cada extracción se cuantificó en el equipo NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Para la secuenciación de genoma completo los ADN de las cepas fueron enviados a Translational Genomics Research Institute –TGen North, en Flagstaff, Arizona (EUA). Allí, se utilizó aproximadamente 1 µg de ADN purificado de cada cepa para la preparación de la biblioteca de secuenciación utilizando el kit KAPA para la secuenciación de Illumina NGS (Kapa Biosystems). Las bibliotecas se indexaron y cuantificaron utilizando un kit de cuantificación de biblioteca Kapa (Kapa Biosystems) en un instrumento 7900HT (Life Technologies). Luego, fueron secuenciadas a una longitud de lectura de 100 pb en un instrumento Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA).

Los nuevos perfiles genéticos de *Paracoccidioides* spp. obtenidos en este estudio fueron comparados con los publicados previamente por Muñoz y col. (14). El perfil de los SNPs se evaluó utilizando NASP pipeline (15).

Las relaciones evolutivas de las nuevas secuencias de los aislamientos de *Paracoccidioides* spp. se realizaron mediante análisis filogenómico utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) implementados en el software IQ-TREE (16).

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

Se analizaron los perfiles genéticos de 31 aislamientos de *Paracoccidioides* de Argentina (14), Paraguay (5), Venezuela (7), Brasil (1), Bolivia (1), Perú (1) y dos sin datos sobre el origen de las cepas, y se compararon con perfiles previamente publicados por Muñoz y col. (14).

En la tabla 1 se listan las características de los aislamientos incluidos en el estudio.

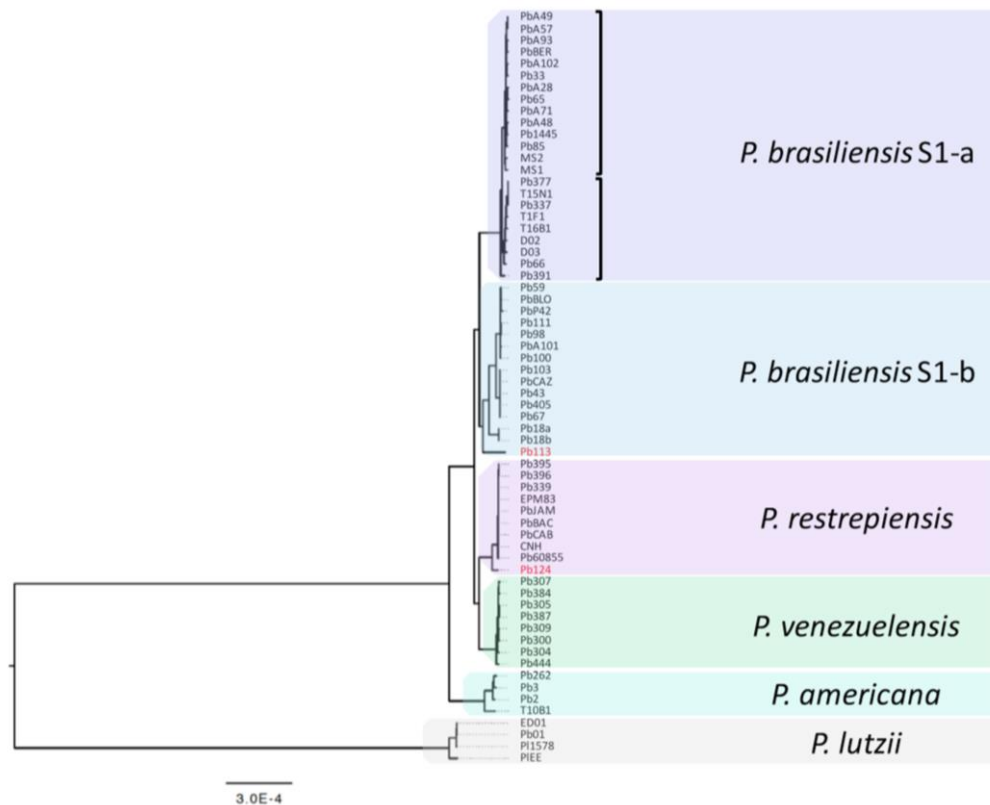
**Tabla 1.** Características clínico-epidemiológicas y moleculares de los 31 aislamientos de *Paracoccidioides* secuenciados por genoma completo en este estudio.

ID	Country	Region	Collection Date	Clinical Form	Species
PbA28	Argentina	NEA	2014	Chronic	S1a
Pb33	Argentina	NEA	2014	Chronic	S1a
Pb43	Argentina	NOA	2014	Acute	S1b
PbA48	Argentina	NEA	2014	Chronic	S1a
PbA49	Argentina	NEA	2014	Chronic	S1a
PbA57	Argentina	NEA	2014	Chronic	S1a
Pb65	Argentina	NEA	2015	Chronic	S1a
PbA71	Argentina	NEA	2015	Chronic	S1a
Pb85	Argentina	NEA	2015	Chronic	S1a
PbA93	Argentina	NEA	2016	Unifocal Bone PCM	S1a
Pb100	Argentina	NEA		Chronic	S1b
PbA102	Argentina	NOA	2004	Chronic	S1a

<b>Pb103</b>	Argentina	NEA	1981	Acute	S1b
<b>Pb405</b>	Argentina	NOA		Acute	S1b
<b>Pb67</b>	Bolivia		2015	Chronic	S1b
<b>Pb391</b>	Brasil	Guaranésia		Chronic	S1a
<b>Pb101</b>	Paraguay			Chronic	S1b
<b>PbP42</b>	Paraguay		2014	Acute	S1b
<b>Pb59</b>	Paraguay		2014	Chronic	S1b
<b>Pb98</b>	Paraguay		1999	Chronic	S1b
<b>Pb111</b>	Paraguay			PCM	S1b
<b>Pb124</b>	Perú			PCM	PS3
<b>Pb304</b>	Venezuela	Barinas	1988	Chronic	PS4
<b>Pb305</b>	Venezuela	Vargas	1988	Chronic	PS4
<b>Pb307</b>	Venezuela	Vargas	1991	Chronic	PS4
<b>Pb309</b>	Venezuela	Miranda	1994	Chronic	PS4
<b>Pb384</b>	Venezuela	Anzoátegui	1971	Chronic	PS4
<b>Pb387</b>	Venezuela	Miranda	1983	Acute	PS4
<b>Pb444</b>	Venezuela	Miranda	2004	Chronic	PS4
<b>Pb395</b>					PS3
<b>Pb396</b>					PS3

**NEA: noreste argentino; NOA: noroeste argentino; PCM: Paracoccidioidomicosis (sin datos de la forma clínica).**

La figura 1 muestra el árbol de máxima verosimilitud generado por la tipificación de SNP del genoma completo. Los datos genómicos de *Paracoccidioides* ha sido ampliado al doble con los generados en este estudio, totalizando 59 genomas disponibles secuenciados en forma completa.



**Figura 1.** Árbol de máxima verosimilitud generado por la tipificación de SNP del genoma completo que muestra las principales entidades genéticas de *Paracoccidioides* informadas hasta el momento.

El análisis filogenético muestra que en Argentina hay 2 genotipos endémicos diferentes de *P. brasiliensis*: *P. brasiliensis* S1a y S1b. En contraste, los aislamientos paraguayos se agruparon sólo con el genotipo S1b. Cuando se compararon los perfiles genéticos con los publicados por Muñoz y col. (14) observamos que los aislamientos de *P. brasiliensis* S1b de Argentina y Paraguay se agrupan con el aislamiento proveniente de Bolivia, la cepa de referencia Pb18 y aislamientos S1b de amplia distribución en Brasil. Esto concuerda con lo hallado por Muñoz (14), donde se vio a S1b como el linaje más altamente recombinante y diverso, lo que se cree que puede contribuir a su dispersión y supervivencia.

Cuando analizamos el grupo genético del linaje S1a, vemos que los aislamientos argentinos y dos provenientes del estado de Mato-Grosso (medio oeste de Brasil) forman un clado monofilético (S1aARG) que está separado de los aislamientos del estado de San Pablo (sureste de Brasil), evidenciando un alto nivel de relación geográfica en este grupo genético.

De acuerdo con el hecho de que el NEA tiene la mayor incidencia de PCM en Argentina, 12 de 14 aislamientos argentinos incluidos en este estudio son de esta región. El 83.3% de ellos pertenecen a *P. brasiliensis* S1aARG. Los mismos se recuperaron de formas crónicas de la enfermedad, excepto uno que se recuperó de una biopsia ósea de un trabajador rural de 33 años de la provincia de Chaco (PbA93), con serología no reactiva. Los dos únicos aislados de NEA que pertenecen a *P. brasiliensis* S1b se encontraron en un niño de 8 años de Chaco (PbA103) y el otro en un paciente adulto de la provincia de Corrientes con una forma crónica de PCM (PbA100). En esta región la PCM crónica se presenta hasta en un 90% de los casos.





## BIBLIOGRAFIA

1. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(11):e367–77.
2. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011;49(8):785–98.
3. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi*. 2017 Jan 3;3(1):1–13.
4. Canteros CE, Rivas MC, Soria M, Lee W, Perrotta D, Rodero L, et al. Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: Estudio multicéntrico en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2004;36(2):68–74.
5. Davel G, Canteros CE. Situación de las micosis en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2007;39:28–33.
6. Negroni R. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis, Lutz's Mycosis). *Int J Dermatol*. 1993;32(12):847–59.
7. Tracogna MF, Fernández Lugo S, Gariboglio Vázquez ML, Fernández MS, Andriani ME, Presti SE, et al. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con paracoccidioidomycosis diagnosticados en un hospital de Resistencia, Chaco. *Rev Argent Microbiol*. 2018.
8. Giusiano G, Aguirre C, Vratnica C, Rojas F, Corallo T, Cattana ME, et al. Emergence of acute/subacute infant-juvenile paracoccidioidomycosis in Northeast Argentina: Effect of climatic and anthropogenic changes? *Med Mycol*. 2019;57(1):30–7.
9. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, Mcewen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol*. 2017;106(May):9–25.
10. Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM De, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014;52(1):19–28.
11. Theodoro RC, Teixeira MDM, Felipe MSS, Paduan KDS, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One*. 2012;7(5):e37694.
12. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ a, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52(2):273–83.
13. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes B a, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(1):65–73.
14. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere*. 2016;1(5):e00213-16.
15. Roe C, Smith DE, Williamson CHD, Aziz M, Keim P, Hepp CM, et al. NASP: an accurate, rapid method for the identification of SNPs in WGS datasets that supports flexible input and output formats. *Microb Genomics*. 2016;2(8):1–12.
16. Nguyen L, Schmidt H, von Haeseler A, Minh B. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32(1):268–74.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is one of the main systemic mycosis reported in Argentina, mostly at the northeast. The genetic profile of *Paracoccidioides* and its relationship to the disease is unknown. Thus, we sequenced 19 isolates of *Paracoccidioides* from Argentina and Paraguay as well additionally, isolates from Venezuela, Brazil, Bolivia, and Peru and compared with publicly available genomes. Interestingly, PCM in Argentina and Paraguay is caused by two distinct *P. brasiliensis* populations: S1a and S1b. Additionally, within the *P. brasiliensis* S1a clade, the specimens from Argentina and Mato Grosso do Sul cluster separately from isolates obtained in Southeastern Brazil. The majority of strains from Northwest Argentina and eastern Paraguay group with the *P. brasiliensis* S1b population, suggesting differential ecological selection pressure between those genotypes. Population genomics revealed 5 main populations with limited gene flow: *P. brasiliensis* (S1a), *P. brasiliensis* (S1b), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) and *P. venezuelensis* (PS4).

# ESTUDIO DE LA RESERVA MEDULAR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO. IMPORTANCIA TERAPÉUTICA

## IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS FENOTÍPICOS, METABÓLICOS Y MOLECULARES EN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA QUE CONTRIBUYEN A LA FORMACIÓN DEL NICHOPRE-METASTÁTICO ÓSEO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO

Francisco Raúl Borzone<sup>1</sup>, Gustavo Yannarrelli<sup>2</sup>, Leandro Marcelo Martinez<sup>3</sup>, María Belén Giorello<sup>1</sup>, Vivian Labovsky<sup>1</sup>, Leonardo Feldman<sup>4</sup>, Emilio Batagelj<sup>5</sup>, Federico Dimase<sup>6</sup>, Norma Alejandra Chasseing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunohematología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, CABA, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>Laboratorio de Regulación Génica y Células Madre, Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMETTYB), Universidad Favaloro-CONICET, CABA, Buenos Aires, Argentina; <sup>3</sup>Hospital For Special Surgery, New York, New York, EEUU; <sup>4</sup>Departamento de Trasplante de Médula Ósea, Fundación Favaloro, CABA, Buenos Aires, Argentina; <sup>5</sup>Servicio de Oncología, Hospital Militar Central, CABA, Buenos Aires, Argentina; <sup>6</sup>Servicio de Hematología, Hospital Militar Central, CABA, Buenos Aires, Argentina

### Resumen

La metástasis ósea es responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer de mama. La mayoría de las pacientes con cáncer de mama (**PCM**) avanzado desarrollan metástasis ósea de tipo osteolítica como resultado del desequilibrio entre los procesos de osteogénesis, osteoclastogénesis y resorción ósea.

En el presente trabajo, encontramos que las células madre mesenquimales (**MSC**) de médula ósea (**MO**) de las PCM avanzado (estadío clínico III-B, carcinoma ductal infiltrante, libre de tratamiento y menopáusicas) presentaron fundamentalmente alteraciones moleculares características de células en proceso de senescencia, las cuales se identificaron por tener fundamentalmente una disminución de la actividad de la telomerasa y disminución del largo telomérico paralelo al incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (**ROS**). Alteraciones moleculares, que son en parte responsables de la disminución de las capacidades de autorrenovación y multipotencialidad observada, previamente, en las MSC de estas PCM, en particular la diferenciación osteogénica, así como del incremento de la expresión y liberación de factores que regulan positivamente los procesos de osteoclastogénesis. Más aún, estas PCM presentaron un aumento del porcentaje de estas células madre adultas en el período Go/G1 del ciclo celular, observación que se relacionó con una disminución de su capacidad proliferativa, así como con cambios morfológicos que se acompañaron de un incremento del área celular y mayor tamaño de su eje elíptico menor respecto a los valores de las MSC de MO de donantes sanos. Todas las alteraciones encontradas contribuyen a la formación de un “*nicho pre-metastásico*” o “*pre-maligno*” en la MO/ hueso de estas pacientes en este momento de la evolución tumoral.

Finalmente, el conocer estas diferencias nos permitirá en un futuro cercano plantear estrategias terapéuticas en estas PCM con el propósito final de disminuir o inhibir así la colonización de las células tumorales mamarias en la MO y el tejido óseo.

**Objetivo general:** *normalizar a futuro el microambiente hematopoyético de médula ósea (MO) de pacientes con cáncer de mama avanzado (PCM, mujeres en estadio clínico-patológico III-B) favoreciendo los procesos de autorrenovación, proliferación y diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales (MSC), disminuyendo así el proceso de osteoclastogénesis que estas mismas células madre promueven en estas pacientes. El poder normalizar o mejorar estos procesos, responsables de la creación de un nicho pre-metastásico óseo, podría inhibir o al menos retrasar la colonización de MO/ hueso por las células tumorales mamarias.*

#### **Objetivo Específico evaluado**

**1)-** *Identificar parámetros, en particular a nivel fenotípico, metabólico y molecular, que nos permitan explicar fundamentalmente el desbalance de los procesos antes mencionados en las MSC de la MO de estas PCM avanzado.*

#### **Tareas evaluadas para cumplir este objetivo específico, tanto en PCM como en mujeres donante sanas de MO:**

**a) Estudio de las características fenotípicas relacionadas fundamentalmente con la autorrenovación, proliferación y diferenciación osteogénica de las MSC:** se analizó el % de MSC que expresan y el nivel de expresión por célula de: CD73, CD90, CD105, Cd49b, CD49d, CD49f, CD106, y CD146. Y como controles negativos o bajísima expresión de CD14, CD11b, CD19, CD79a, CD34 y HLA de clase II-DR,

**b) Estudio de la capacidad de clonado o autorrenovación de las MSC:** se realizó a través del ensayo de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F). Además, se cuantificó el número de células estromales mesenquimales (CEM) por campo en las CFU-F de MSC 3<sup>er</sup> subcultivo, las cuales fueron cultivadas a baja densidad (predominando MSC multipotenciales). Este último resultado, es una medida de la capacidad proliferativa de la MSC que dio origen a esa CFU-F. Y finalmente, se estudió las morfologías celulares de las CEM a través de la medición de las áreas, ejes elípticos mayores y menores, así como por la medición de los Feret máximo y mínimo.

**a) Estudio del ciclo celular y capacidad proliferativa de las MSC.**

**d) Estudio de la actividad de telomerasa, así como el largo de los telómeros, en las MSC.**

**e) Estudio del metabolismo oxidativo, en particular la producción de ROS totales y mitocondriales, en las MSC.**

**Selección de Pacientes y Voluntarias Sanas (VS):** para los estudios se seleccionaron pacientes con carcinoma de mama ductal infiltrante, estadio clínico patológico avanzado III-B, con un rango de edad entre 40 a 70 años ( $X \pm ES = 57,47 \pm 2,72$ ). Para esta clasificación se siguió el sistema TNM (tamaño, presencia de nódulos y metástasis) de la Unión Internacional de Lucha contra el Cáncer. Todos los estudios se realizaron en PCM libres de tratamiento radio o quimioterápico, sin metástasis en MO y hueso, ni ningún otro órgano, menopáusicas (sin tratamiento hormonal), y sin enfermedades que puedan modificar el metabolismo óseo como osteoporosis, hipertiroidismo, paratiroiditis o daño renal. El aspirado de MO se obtuvo antes de la cirugía del tumor primario de mama. Se excluyeron del estudio aquellas PCM que

presentaron otro tumor primario. El rango de edad indicado no fue elegido al azar. Es un hecho conocido que el estadio clínico patológico es independiente de la edad de la paciente pero la mayor frecuencia de muestras que llegan y llegaron a nuestro laboratorio en los últimos 25 años pertenecieron a PCM con un rango de edad entre 40 a 70 años. Esta última observación fue independiente de la institución que suministrara la muestra. Además, se eligió trabajar en pacientes con carcinoma mamario ductal infiltrante pues todos nuestros estudios previos sobre la composición y funcionalidad del microambiente hematopoyético, en particular los de plasticidad de la MSC para dar adipocitos, condrocitos y osteocitos, se hicieron con este tipo de tumor. Las pacientes fueron seleccionadas sin considerar por separado tumores hormono-dependientes o no (R de estrógeno -RE-, R de progesterona -RP-positivos) ni HER-2/neu positivo o no. Dado que el grupo en estudio es muy limitado acorde a todos los criterios de inclusión ya descriptos y sabiendo que independientemente de la caracterización hormonal el 70% de las PCM recurrente muestran evidencias de compromiso óseo, no procedimos a este discernimiento. Esta decisión fue, además, tomada por consejo y acuerdo con los Médicos Oncólogos que participaron del estudio.

En paralelo se evaluaron mujeres VS, con un rango de edad de 40 a 65 años ( $X \pm ES = 46,60 \pm 1,43$ ). Las VS fueron donantes para trasplante alogénico de MO o VS que concurren al Servicio de Hematología que no tenían ningún compromiso medular, ni inmunohematológico.

A todos los individuos se les pidió la aceptación para hacer el estudio por medio de un consentimiento informado. Este trabajo se desarrolló bajo los principios de la Declaración de Helsinki.

El proyecto y los consentimientos informados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Instituto de Biología y Medicina Experimental, y los Hospitales donde se realizaron este trabajo.

**Recolección de muestras:** los aspirados de MO de las PCM y de las VS fueron extraídos bajo anestesia local por punción de la cresta ilíaca posterior y recogidos con solución de heparina sódica 25 UI/ml, sin conservantes como anticoagulante (Gibco, Cat. 15077-019). Se conservó la esterilidad durante el proceso.

## Resultados

### **Estudio de las características fenotípicas de las MSC del 3<sup>er</sup> subcultivo relacionadas fundamentalmente con la autorrenovación, proliferación y diferenciación osteogénica:**

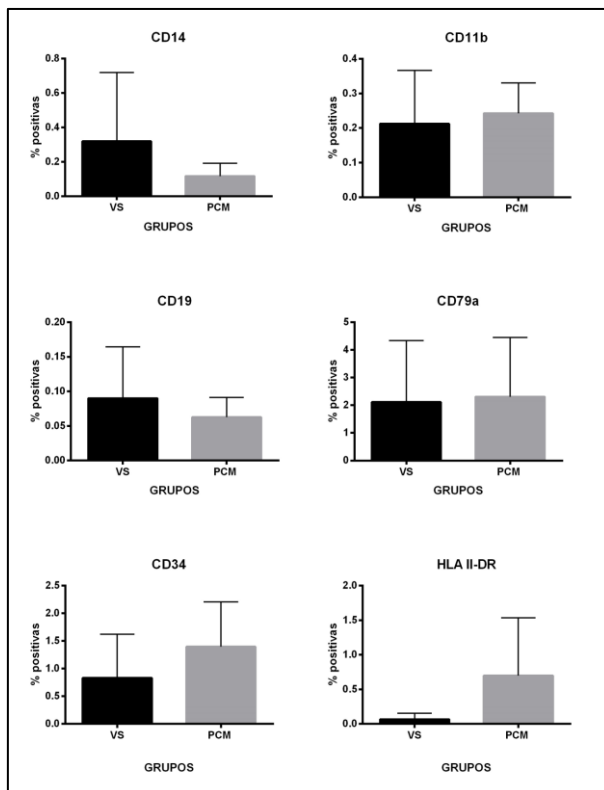
los resultados indicaron que las PCM, respecto a las VS, presentaron un incremento significativo del % de MSC que expresan CD49b, marcador que se ha encontrado que está presente en MSC con baja capacidad de autorrenovación, proliferación y plasticidad, en particular la diferenciación osteogénica (**Figura 1. A**). No encontrándose otra diferencia importante entre ambos grupos.

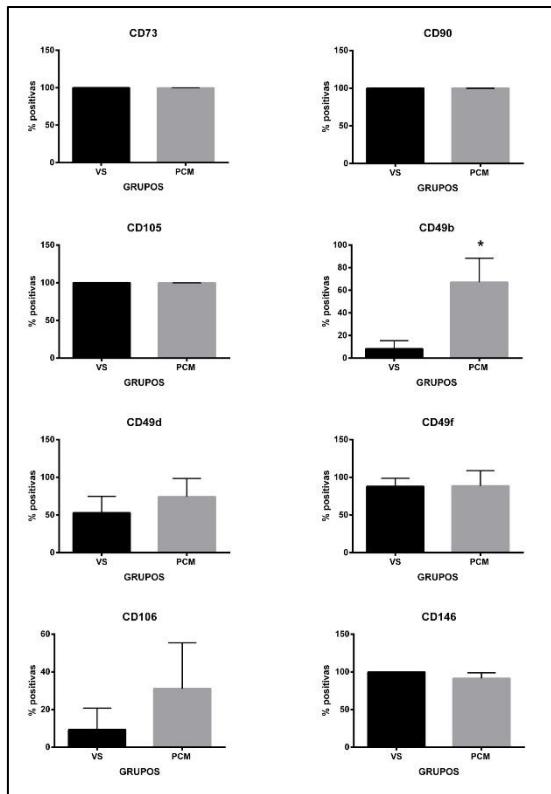
Por otra parte, al analizar la expresión de cada marcador/ MSC (índice de fluorescencia relativa=IFR) se encontró una disminución significativa del marcador CD146/ MSC en las PCM respecto al valor del IFR de las MSC de las VS (**Figura 1. B**). La expresión de CD146 se ha encontrado en MSC alta capacidad de autorrenovación, proliferación, con capacidad de regular positivamente la hematopoyesis y multipotencialidad, en particular la diferenciación osteogénica y formación de una adecuada matriz de mineralización ósea, así como una alta capacidad de migración y de regular negativamente la osteoclastogénesis y resorción ósea.

Por otro lado, si bien se encontraron diferencias significativas en los valores de los IFR de CD34 y HLA-DR en las MSC de las PCM respecto al valor de las MSC de las VS, ambas

expresiones son bajísimas como para tener una implicancia en la funcionalidad de las MSC (**Figura 1. B**). Más aun, el % de MSC con expresión positiva para CD34 y HLA de clase II-DR está entre 0-2%.

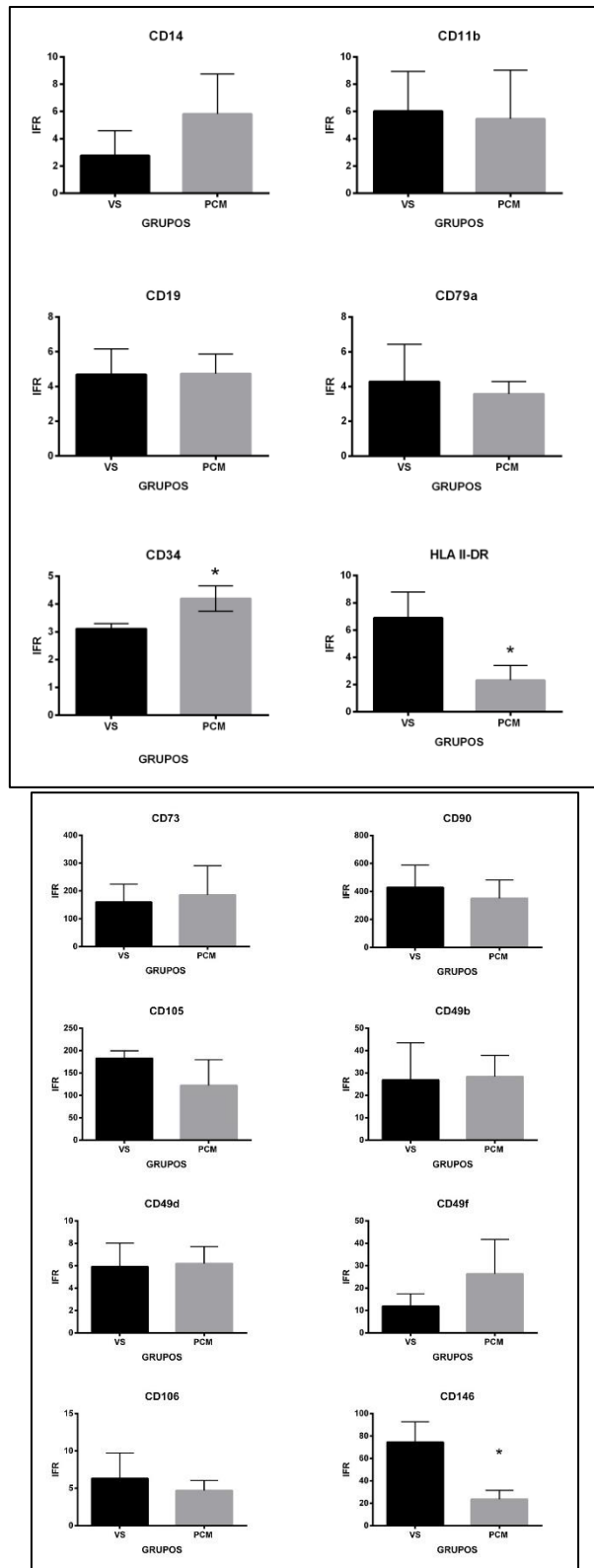
**Figura 1. A:** Porcentaje de MSC que expresan CD14, CD11b, CD19, CD79a, CD34, HLA de clase II-DR, CD73, CD90, CD105, Cd49b, CD49d, CD49f, CD106 y CD146. Los resultados están expresados como  $X \pm ES$  tanto para las MSC de las VS (n= 5) como para las PCM (n= 5). Análisis estadístico: análisis paramétrico, no apareado, por el Test “t” de Student. \*CD49b: p=0019. Técnica de citometría de Flujo.





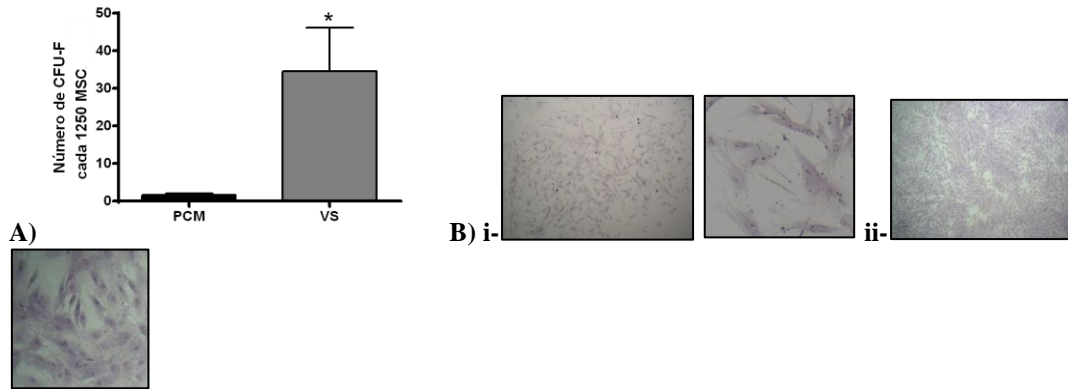
**Figura 1. B:** Nivel de expresión de CD14, CD11b, CD19, CD79a, CD34, HLA de clase II-DR, CD73, CD90, CD105, Cd49b, CD49d, CD49f, CD106 y CD146 por MSC. El nivel de expresión de cada marcador se midió como índice de fluorescencia relativa (IFR) de las mismas. IFR= media del índice de fluorescencia del marcador específico/ media del índice del fluorescencia del control de isotipo correspondiente. Los resultados están expresados como  $X \pm ES$  tanto para las MSC de las VS (n= 5) como para las PCM (n= 5). Análisis estadístico: análisis paramétrico, no apareado, por el Test “t” de Student. \*CD34:  $p=0,0031$ ; HLA II-DR:  $p=0,0060$  y CD146:  $p=0,0168$ . Técnica de citometría de Flujo.





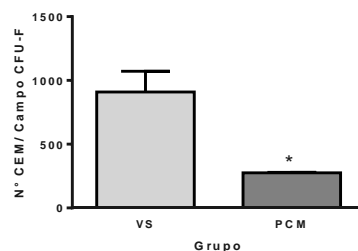
**Estudio de la capacidad de clonado o autorrenovación de las MSC del 3<sup>er</sup> subcultivo para dar CFU-F:** las MSC de las PCM como de las VS presentaron la capacidad de formar colonias *in-vitro*. Además, en forma congruente con nuestros trabajos anteriores, observamos una menor capacidad de clonado de las MSC provenientes de las PCM ( $p=0,0357$ ) (**Figura**

2. A). Más aún, si comparamos la CFU-F de una PCM vs. la de una VS (**Figuras 2. B i y ii**) podemos decir que el tamaño de la colonia es menor en las pacientes (menor número de células/ CFU-F), lo cual indica menor capacidad de autorrenovación y proliferación de las MSC. Al mismo, en las **Figuras 2. B i y ii** se representan una CFU-F tanto de una PCM como de una VS, poniéndose en evidencia que las CEM de las CFU-F de VS presentan formas fusiformes mientras que las CEM de las CFU-F de las pacientes pueden presentar además de la morfología clásica una morfología epiteloide o poligonal. Las condiciones de cultivo utilizadas son selectivas para el desarrollo de células adherentes de origen mesenquimal.



**Figura 2. Formación de CFU-F.** A. Número de CFU-F/1.250 MSC observado para (n=5) y VS (n=5). Los resultados están expresados como X+ES. Análisis estadístico: el asterisco (\*) indica diferencia significativa ( $p=0,0357$ , análisis no paramétrico por el Test de Mann Whitney) entre ambos grupos. B. Ejemplificación representativa de la visualización en microscopio invertido (40X) de las CFU-F de una PCM y una VS, así como la morfología de las CEM (100x) que componen la CFU-F (i-ii, respectivamente). Tinción con Giemsa. Ensayo de CFU-F en medio líquido, plaqueo 50 CEM del 3<sup>er</sup> subcultivo/ cm<sup>2</sup>.

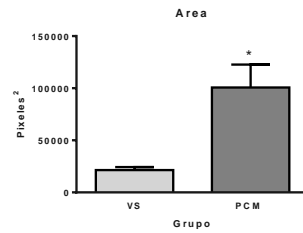
**Cuantificación del número de CEM por campo en las CFU-F de MSC del 3<sup>er</sup> subcultivo. Estudio de las morfologías celulares de las CEM a través de la medición de las áreas, ejes elípticos mayores y menores de las CEM, así como por los Feret máximo y mínimo:** para confirmar el menor tamaño de las CFU-F originadas a partir de las MSC del 3<sup>er</sup> subcultivo de las PCM respecto al valor obtenido en las VS, se cuantificó el número de CEM/campo leído. Los resultados indicaron una disminución significativa en los cultivos de las PCM respecto a los valores que presentaron las VS (**Figura 3**). Por lo cual, podemos concluir efectivamente que las MSC de las PCM presentaron menor capacidad de autorrenovación y proliferación. Recordemos que las MSC se dividen en forma asimétrica dando una célula madre idéntica y un precursor/progenitor.



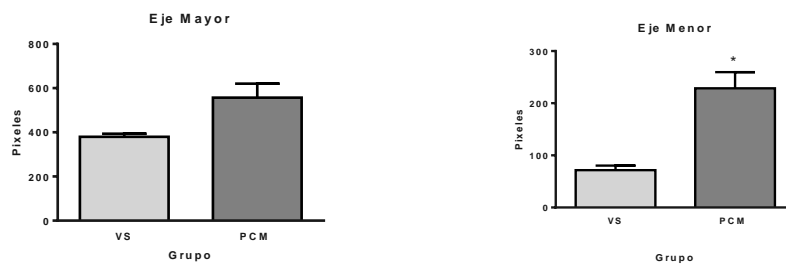
**Figura 3. Número de CEM por campo en las CFU-F.** Los valores fueron expresados como X+ES. Se evaluaron 3 muestras de cada grupo. Significación estadística: análisis paramétrico, no apareado, por el Test "t" de Student. \*:  $p=0,0235$ . El estudio se realizó usando el programa ImageJ1.51 f (National Institutes of Health, USA), analizándose la cantidad de núcleos teñidos con Giemsa.

Por otra parte, se midieron áreas, eje elíptico mayor y menor, así como Feret máximo y Feret mínimo (**Figura 4, 5 y 6**) de las CEM de las colonias, resultados que indican un aumento de los valores de estos parámetros en las PCM con respecto a los valores de las VS. Incrementos

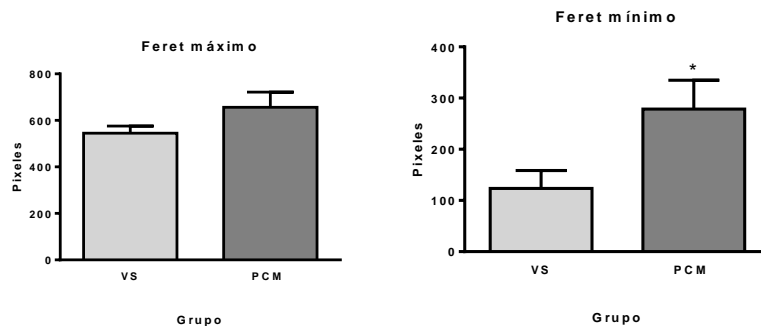
que fueron significativo en las mediadas del área, eje elíptico menor y Feret mínimo en el grupo de pacientes, con un  $p=0,0235$ ;  $0,0081$  y  $0,0157$ , respectivamente.



**Figura 4. Medida del Área de las CEM del ensayo de CFU-F.** Los valores fueron expresados como X+ES. Se evaluaron 3 muestras de cada grupo. Significación estadística: análisis paramétrico, no apareado, por el Test “t” de Student. \*:  $p=0,0235$ . El estudio se realizó usando el programa ImageJ1.51 f (National Institutes of Health, USA).



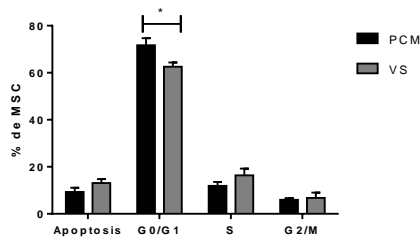
**Figura 5. Medida del Eje elíptico mayor y menor de las CEM del ensayo de CFU-F.** Los valores fueron expresados como X+ES. Se evaluaron 3 muestras de cada grupo. Significación estadística: análisis paramétrico, no apareado, por el Test “t” de Student. \*:  $p=0,0081$ . El estudio se realizó usando el programa ImageJ1.51 f (National Institutes of Health, USA).



**Figura 6. Medida del Feret máximo y mínimo de las CEM del ensayo de CFU-F.** Los valores fueron expresados como X+ES. Se evaluaron 3 muestras de cada grupo. Significación estadística: análisis paramétrico, no apareado, por el Test “t” de Student. \*:  $p=0,0157$ . El estudio se realizó usando el programa ImageJ1.51 f (National Institutes of Health, USA).

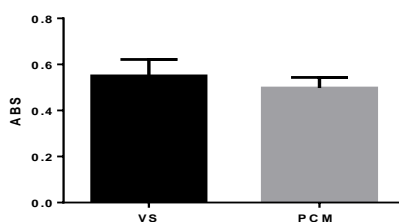
De los resultados presentados en este apartado podemos decir que un alto porcentaje de las MSC del 3<sup>er</sup> subcultivo de las PCM avanzado, estadio III-B, presentan una forma asimétrica, con valores de área celular y eje elíptico menor aumentados, así como valores de Feret mínimo incrementados. Y estas anomalías, coinciden con el hecho que un alto porcentaje de estas MSC presentan menor eficiencia de clonado (autorrenovación y proliferación), características que se asocian a MSC con bajas capacidades de diferenciación o multipotencialidad, en particular osteogénica y de regulación positiva de la hematopoyesis.

**Estudio del ciclo celular de las MSC del 4<sup>to</sup> subcultivo:** el análisis de los datos mostró que las PCM presentaron un aumento significativo del porcentaje de MSC en estadio G0/G1 respecto a los valores de las VS ( $p=0,0143$ ). **Figura 7.**



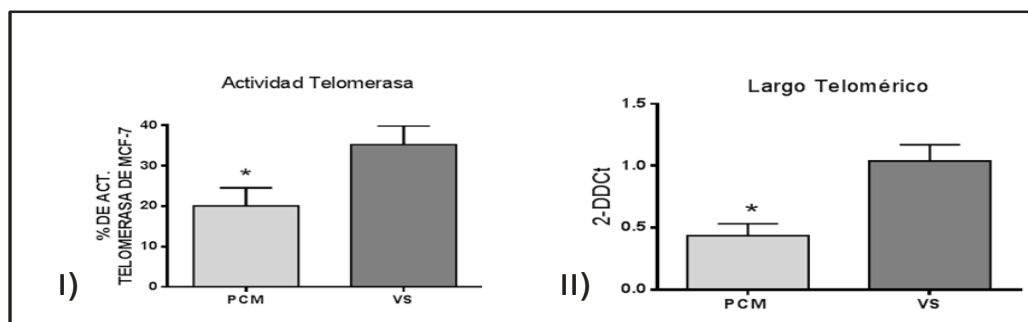
**Figura 7. Estudio del ciclo celular de las MSC de MO de PCM (n=5) y VS (n=5).** Los resultados fueron expresados como X+ES. Significación estadística: análisis no paramétrico, no apareado, por el Test de Mann-Whitney. \*: p=0,0143. Evaluación por citometría de flujo mediante tinción con ioduro de propidio en presencia de RNase A.

**Estudio de la capacidad proliferativa de las MSC del 4<sup>to</sup> subcultivo:** las MSC de las PCM presentaron una tendencia a presentar menor capacidad de proliferación con respecto a las MSC de las VS en el cuarto subcultivo. **Figura 8.**



**Figura 8. Estudio de la capacidad proliferativa de las MSC de PCM (n=5) y VS (n=5).** Los resultados fueron expresados como X+ES. ABS: absorbancia. Kit de proliferación por reacción colorimétrica con MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt].

**Estudio de la actividad de la telomerasa y del largo telomérico en las MSC del 4<sup>to</sup> subcultivo:** los datos de la actividad de la telomerasa indicaron que las MSC de las PCM tuvieron una disminución significativa de los valores respecto al de las VS (p=0,0022, **Figura 9. I**). Respecto al largo de los telómeros, las MSC de las PCM tuvieron una disminución significativa, con valores inferiores a los de las VS. (p=0,0022, **Figura 9. II**).

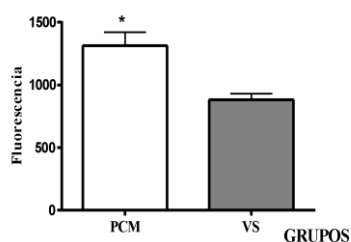


**Figura 9. Estudio de la actividad de la telomerasa y la extensión de los telómeros en las MSC: I)** Estudio de la actividad de la telomerasa en las MSC de las PCM (n=6) y VS (n=6). Datos (X+ES) expresados como el porcentaje de actividad de la telomerasa con respecto a aquella observada en células tumorales mamarias de la línea MCF-7. Significación estadística: análisis paramétrico, no apareado, por el Test "t" de Student, \*: p=0,0022. **II)** Estudio del largo telomérico en las MSC de las PCM (n=9) y VS (n=6). Datos (X+ES) expresados como 2-ΔCt [ciclo umbral=threshold cycle (Ct) normalizado mediante GAPDH]. Significación estadística: análisis paramétrico, no apareado, por el Test "t" de Student, \*: p=0,0022. La actividad de TERT se estudió a partir de extractos proteicos mediante la técnica de *real time-PCR*, la cual evalúa la habilidad de la telomerasa de extender un primer exógeno como describe Yannarelli G y colab. (*Stem Cells* 2013, 31: 215-220). Por último, la extensión de los telómeros se estudió a partir de DNA genómico mediante la técnica de *real time-PCR* como describe Yannarelli G y colab. (*Stem Cells* 2013, 31: 215-220).

**Estudio del metabolismo oxidativo, en particular la producción de ROS totales y mitocondriales, en las MSC del 4<sup>to</sup> subcultivo:** los resultados muestran un incremento

significativo de los niveles de ROS totales intracelulares en las MSC de las PCM respecto a los valores encontrados en las VS. Valores de ROS totales intracelulares, expresados como  $X \pm ES$  (Fluorescencia Relativa): PCM=1.330,000 $\pm$ 74,580 y VS=882,100 $\pm$ 25,470 ( $p=0,0020$ ).

**Figura 10.**



**Figura 10. Estudio de ROS totales intracelulares en las MSC.** Valores expresados como  $X \pm ES$  (Fluorescencia Relativa) en las MSC de las PCM ( $n=6$ ) y VS ( $n=6$ ). Significación estadística: análisis no paramétrico, no apareado, por el Test de Mann Whitney, \*:  $p=0,0020$ . La evaluación de ROS totales se realizó con un Kit específico de Cell Biolabs, por citometría de flujo.

Además, los estudios hasta hora realizados indican que los niveles de ROS mitocondrial son semejantes en ambos grupos y mínimos comparados a los valores correspondientes a ROS totales. Valores de ROS mitocondrial ( $O_2^-$ ), expresados como  $X \pm ES$  (Fluorescencia Relativa): PCM= 16,970 $\pm$ 2,060 y VS= 15,700 $\pm$ 0,300 (la evaluación de ROS mitocondrial se realizó con un Kit específico de Cell Biolabs, por citometría de flujo).

## Discusión

Del presente trabajo podemos decir que las **MSC purificadas del 3<sup>er</sup> subcultivo de MO de las PCM avanzado**, previo a la aparición de las metástasis óseas, **presentaron cambios significativos en comparación con las MSC de VS, a saber: 1)- menor capacidad de autorrenovación y proliferación** [por su menor número de CFU-F en el cultivo y menor tamaño de CFU-F, anomalías morfológicas (formas menos fusiformes, tipo “blanket cell type” o poligonal, asimétrica) y de tamaño celular en las CFU-F (células con mayor área y mayores valores de eje elíptico menor y feret menor)] y **2)- mayor % de MSC-CD49b** (molécula asociada a MSC con baja autorrenovación y proliferación) y menor expresión (IFR) de CD146/MS (molécula asociada a MSC con elevada autorrenovación y proliferación). Estas observaciones coinciden con lo que ocurre con las MSC de MO humana durante los procesos de senescencia y metabolismo oxidativo aumentado, donde la actividad de la telomerasa disminuye y por ende el largo de los telómeros no se conserva, siendo esta actividad de la telomerasa ciclo celular dependiente, ya que su expresión está “up-regulated” en la fase S [1-3].

Por otro lado, hoy se sabe, que en el cultivo de MO humana normal, existen dos tipos de MSC, una con alta capacidad proliferativa, menor tamaño, mayor largo de telómeros, con alta expresión en membrana del receptor  $\alpha$  para PDGF (CD140A, relacionado con la autorrenovación) y STRO-1 (relacionado con la formación ósea, la inmunosupresión y la multipotencialidad), así como con alta expresión de los RNAm de los factores de transcripción TWIST1 y DERMO (relacionados con la autorrenovación y compromiso de las MSC), mayor capacidad osteogénica y de formación de un tejido mineralizado y otra subpoblación de MSC, con baja capacidad proliferativa y con una disminución de todos los parámetros que se encuentran aumentados en la otra población [4]. Al respecto, en nuestro trabajo encontramos en las **MSC del 4to subcultivo de MO de las PCM avanzado vs. las MSC de VS: 1)- aumento significativo del porcentaje de MSC en estadio G0/G1** y una tendencia a presentar menor capacidad de proliferación y **2)- disminución significativa del largo telomérico y actividad TERT**. Es decir, las MSC de MO de las PCM avanzado tendrían

un comportamiento semejante a la subpoblación de MSC con baja capacidad proliferativa descrita por otros autores, como comentamos anteriormente [4].

Por otra parte, se sabe que toda las CEM, incluyendo las MSC o progenitores mesenquimales de MO humana normal, sólo pueden proliferar por un número limitado de pasajes sucesivos [3]. Observaciones, que vuelven a confirmarse en el presente trabajo, donde las **MSC purificadas del 3<sup>er</sup> subcultivo de MO de las PCM avanzado** presentaron menor proliferación dentro de la CFU-F y **en el 4<sup>to</sup> subcultivo**, que hubo un mayor número de células en fase Go/G1 y una tendencia a presentar menor capacidad proliferativa en este grupo de pacientes respecto a los valores de las VS. Como dijimos en un inicio, las investigaciones muestran que al limitarse las divisiones celulares, la célula entra en un proceso de senescencia donde hay acumulación de daño del DNA, pérdida del largo de los telómeros, aumento del consumo de oxígeno con incremento del metabolismo oxidativo, cambios de tamaño y morfología, aumento de supresores tumorales P16, P21, P53 y/ o RB, incremento de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa y pérdida de la habilidad de sintetizar DNA [3, 5]. Al respecto de la producción de ROS, nosotros hemos encontrado en este trabajo, un incremento significativo de los niveles de ROS totales intracelulares en las **MSC del 4<sup>to</sup> subcultivo de MO de las PCM avanzado vs. las MSC de VS**. Es decir, los cultivos de las PCM avanzado tuvieron un mayor número de células en condición de arresto celular, con niveles de actividad de telomerasa bajos, lo cual llevaría a pérdida de la longitud de los telómeros. La actividad de la telomerasa es la que contribuye a la estabilidad genética a través de mantener el largo de los telómeros y por otro lado, disminuir el estrés oxidativo posiblemente por controlar la fisiología mitocondrial de la MSC, siendo el anión superóxido la ROS más comprometida. Por su lado, el incremento de ROS lleva a la modificación de genes y a numerosas aberraciones citogenética [3].

Volviendo a la actividad de la telomerasa y del largo de los telómeros, hoy se sabe que preservan en la MSC de MO su capacidad de autorrenovación, proliferación, su multipotencialidad, en particular su diferenciación osteogénica, así como su capacidad de crear un ambiente no favorable para la formación de osteoclastos y la actividad resorptiva que estos últimos ejercen [6].

Por otro lado, los ROS juegan un papel fundamental en la modulación negativa de los componentes de la matriz extracelular como son el colágeno, los proteoglicanos y el ácido hialurónico [7-9]. Estos tres componentes de matriz son esenciales para la formación de CFU-F y CFU-mieloide. Además, en el caso particular del colágeno de tipo I, es esencial para conservar la funcionalidad de las MSC, en particular en lo referente a su capacidad de diferenciación osteogénica y su migración a la superficie del hueso, esta último a través de la acción quimiotáctica de CCL-2 o MCP-1 y CCL-3 o MIP-1 $\alpha$  [10-13].

*Finalmente, teniendo en cuenta los resultados encontrados y las observaciones de otros autores, anteriormente comentadas, podemos concluir que las MSC de MO de las PCM avanzado en comparación con las MSC de las VS presentan fundamentalmente diferentes características fenotípicas y moleculares que explican, en parte, sus fallas a nivel de autorrenovación, proliferación, diferenciación osteogénica y regulación de la osteoclastogénesis. Alteraciones todas que contribuyen a la formación de un nicho “pre-metastásico” o “pre-maligno” en la MO de estas pacientes en este momento de la evolución tumoral. Por lo tanto, los datos obtenidos servirán para plantear a futuro estrategias terapéuticas con el propósito final de disminuir o inhibir la colonización de la células tumorales mamarias en MO/hueso.*

## Referencias

- 1) *Bioch & Biophysical Res Commun* 2008, 369: 1114-1119.
- 2) *Gene* 2013, 519: 348-355.
- 3) *Cell Death and Disease* 2013, 4: e691.
- 4) *Stem Cells* 2015, 33: 1878-1891.
- 5) *Genes Dev* 2010, 24: 2463-2479.
- 6) *World J Stem Cells* 2014, 6: 94-110.
- 7) *Arthritis Rheum* 1980, 23: 455-463.
- 8) *Arthritis Rheum* 1976, 19: 799-806.
- 9) *Br Med Bull* 1987, 43: 371-385.
- 10) *J Bone Miner Res* 2007, 22: 1943-1956.
- 11) *Bone* 2015, 70: 62-65.
- 12) *PlosOne* 2014, 9: e 104954.
- 13) *Cell Adhesion & Migration* 2010, 4: 235-240.

## **Abstract**

Bone metastasis is responsible for the majority of breast cancer-related deaths. Most of advanced-breast cancer patients (**BCP**) develop osteolytic bone metastasis as a result of the imbalance between osteogenesis, osteoclastogenesis and bone resorption processes. In the present study, we found that bone marrow (**BM**)-mesenchymal stem cells (**MSC**) from advanced BCP (III-B clinical stage, invasive ductal breast carcinoma, without treatment and with menopausal status) had important molecular changes characteristics of stem cells in a process of senescence, which were identified by having a decrease in telomerase activity and telomerase length decrease, as well as an increase of the production of reactive oxigene species (**ROS**). These last modifications, are partly responsible for the decrease in self-renewing and multipotential capacities previously observed in the MSC of these BCP, in particular osteogenic differentiation, as well as increased expression and release of factors that regulate positively osteoclastogenesis and bone resorption processes. Moreover, these BCP showed an increase in the percentage of these adult stem cells in the Go/G1 period of the cell cycle, observation that was related to a decrease in their proliferative capacity, as well as with morphological changes that were accompanied by an increase in the cell area and larger size of it minor elliptical axe with respect to the values corresponding to the MSC of healthy donors. Therefore, all the alterations found contribute to the formation of a "pre-metastatic niche" or "pre-malignant niche" in the BM/ bone of these patients at this time of tumor evolution.

Finally, our findings suggest that early therapeutic intervention may be required to "normalize" the behavior of the BM-MSC from advanced-BCP and thus diminish or inhibit the metastatic occurrence.



ESTUDIO ECO-EPIDEMIOLÓGICO DE ENFERMEDADES  
TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS EN UN ÁREA URBANA  
PROTEGIDA: RESERVA ECOLÓGICA COSTANERA SUR (CIUDAD  
AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES)

Gabriel L. Cicuttin, M. Nazarena De Salvo

Institución: Instituto de Zoonosis Luis Pasteur

## I. Introducción

Las enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas son consideradas enfermedades emergentes y reemergentes en numerosos lugares del mundo, incluso en nuestro país.

Las rickettsiosis son enfermedades zoonóticas causadas por bacterias intracelulares obligadas del género *Rickettsia*. En los últimos tiempos se ha producido un incremento en la ocurrencia de rickettsiosis en áreas urbanas, reconociéndose nuevos patógenos humanos (*Rickettsia felis* y *Rickettsia massiliae*), y además patógenos relacionados con áreas silvestres comenzaron a detectarse en ambientes urbanos, tal como *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia parkeri*, principalmente debido a que vertebrados reservorios y ectoparásitos vectores comenzaron a ser frecuentes en las ciudades, especialmente en áreas urbanas protegidas. En Argentina, tres especie de rickettsias (*R. rickettsii*, *R. parkeri* y *R. massiliae*) han producido casos humanos.

Las ehrlichiosis y anaplasmosis son causadas por bacterias intracelulares obligadas de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* (familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiales, filo Proteobacterias). Son agentes etiológicos de enfermedades de perros y otros cánidos, humanos y rumiantes como vacas, cabras, ovejas y llamas. En Argentina, en una encuesta serológica en la provincia de Jujuy se detectaron anticuerpos reactivos contra *Ehrlichia chaffeensis* -o una especie de *Ehrlichia* antigénicamente relacionada- en sueros humanos y posteriormente se detectó molecularmente en garrapatas *Amblyomma parvum* de Santiago del Estero y San Luis. *Ehrlichia canis* ha sido detectada en perros con signos compatibles del área metropolitana de Buenos Aires, así como en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* del norte del país.

Las borreliosis son causadas por bacterias en forma de espiroquetas gram-negativas del género *Borrelia* (familia Spirochaetaceae, orden Spirochaetales, filo Spirochaetes). El grupo de la Enfermedad de Lyme es transmitido por garrapatas duras. En Argentina, *Borrelia burgdorferi* sensu lato fue detectada en garrapatas *Ixodes parvicinus* de Jujuy e *Ixodes* sp. cf. *I. neuquenensis* e *I. sigelos* de la región patagónica. No hay confirmación de ocurrencia de casos autóctonos de enfermedad de Lyme en nuestro país.

La Reserva Ecológica Costanera Sur (RECS) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) es un área urbana protegida que presenta una gran variedad de

ambientes, con abundancia de aves y roedores, y presencia de caninos domésticos vagabundos. Por otro lado, vecino a la RECS se ubica el asentamiento Rodrigo Bueno, con una población estimada de 700 familias y con presencia de numerosos perros sueltos que circulan libremente entre el barrio y la RECS.

## II. Objetivo

Estudiar aspectos epidemiológicos de las garrapatas (riqueza específica, distribución estacional, rol como potenciales vectores de microorganismos patógenos) y de los microorganismos patógenos transmitidos por garrapatas (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Borrelia*) en la Reserva Ecológica Costanera Sur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en el período 2011-2014.

## III. Metodología

**Muestreo.** Las garrapatas fueron colectadas de la vegetación entre abril 2013 y marzo 2014, en forma mensual de tres sitios de la RECS. El muestreo fue realizado por dos métodos: bandera y trampas de dióxido de carbono, dado que algunas especies y/o estadios de garrapatas son más factibles de colectar según la metodología utilizada.

**Caninos domésticos.** Entre Abril de 2013 y Marzo de 2014, el personal de la RECS colectó garrapatas sobre caninos con hábitos de vagabundeo.

**Roedores.** Entre Octubre de 2011 y Noviembre de 2013 se capturaron roedores de las especies *Mus musculus*, *Oligoryzomys flavescens*, *Rattus norvegicus*, *Deltamys kemp* y *Scapteromys aquaticus*. Las áreas de captura fueron las mismas o cercanas a los sitios de recolección de garrapatas de vegetación. Los cadáveres fueron conservados en etanol al 70 % y revisados bajo lupa estereoscópica buscando por todo el cuerpo del animal la presencia de garrapatas.

**Conservación.** Todas las garrapatas colectadas se conservaron en etanol al 70 % hasta su identificación taxonómica.

**Clasificación taxonómica de las garrapatas.** Las garrapatas se identificaron bajo lupa estereoscópica siguiendo las claves taxonómicas y por comparación con material de referencia depositado en el INTA EEA Rafaela.

**Extracción de ADN.** Las garrapatas se procesaron en forma individual (adultos y ninfas) o en grupos de 10 ejemplares (larvas). A todas las muestras se les extrajo el ADN mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Alemania). Como control negativo de extracción se utilizó agua libre de nucleasas.

**Reacción en cadena de la polimerasa.** Para la detección de *Rickettsia* spp. se utilizó una PCR simple para amplificar un fragmento del espacio intergénico 23S-5S rRNA. La caracterización molecular de los hallazgos se realizó por PCR para fragmentos de los genes *gltA* y *htrA*. Como control positivo se utilizó *Rickettsia conorii* y como control negativo agua libre de nucleasas.

Para la familia Anaplasmataceae se utilizaron cebadores para un fragmento codificante de ARN ribosomal 16S. La caracterización molecular del género

*Ehrlichia* se realizó por PCR para fragmentos de los genes *dsb* y *groESL* y del género *Anaplasma* con cebadores para los fragmentos de los genes *groESL* y *gltA*. Para la detección de *Borrelia* spp. se utilizó una PCR anidada para un fragmento codificante del gen *fla*. Como control positivo se utilizó *B. burgdorferi sensu stricto* y como control negativo agua libre de nucleasas.

**Secuenciación.** Los productos positivos a la PCR fueron purificados mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU) y posteriormente secuenciados en el Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

**Análisis de los resultados.** Los datos obtenidos fueron codificados e ingresados a una base de datos usando el software EpiInfo 7.1.2.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EEUU) para su correspondiente procesamiento, análisis e interpretación de los resultados.

El análisis filogenético se realizó mediante el método de máxima verosimilitud mediante elección del mejor modelo de sustitución nucleotídica utilizando el criterio de información de Akaike, los espacios fueron excluidos y la topología del árbol fue testada usando 1000 replicaciones de remuestreo (*bootstrap*). Para ello se utilizó el software de análisis de secuencias genéticas MEGA versión 5.0.

## IV. Resultados

### IV.a. Identificación de garrapatas

**Vegetación.** En total se recolectaron 1090 garrapatas de la vegetación, 1076 mediante el método bandera (sitio 2 y 3) y 14 mediante las trampas de CO<sub>2</sub> (sitio 1). La identificación taxonómica determinó que 454 garrapatas pertenecían a la especie *A. aureolatum*, 635 eran *I. auritulus* y sólo 1 ejemplar de *A. triste*.

De *A. aureolatum* los estadios detectados fueron 401 larvas y 53 ninfas, mientras que de *I. auritulus* se juntaron 609 larvas, 24 ninfas y 2 adultos. Por último, el ejemplar de *A. triste* fue un adulto hembra capturada mediante trampa de CO<sub>2</sub>.

**Caninos domésticos.** En total se detectaron 90 ejemplares (87 *A. aureolatum* -83 hembras y 4 machos-; 1 hembra de *A. triste* y 2 *Rh. sanguineus* -1 macho y 1 hembra-).

**Roedores.** Se revisaron los cadáveres de 200 roedores de las especies *Oligoryzomys flavescens* (118), *Mus musculus* (65), *Deltamys kempi* (12) y *Scapteromys aquaticus* (5).

El 36,0 % de los roedores revisados estaba infestado con ectoparásitos. Los ectoparásitos hallados fueron pulgas (45), piojos (57) y ácaros (114). No se encontró ninguna garrapata.

### IV.b. Patógenos bacterianos

#### Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de 1117 garrapatas (1027 colectadas de vegetación y 90 de caninos): 507 *Amblyomma aureolatum*, 606 *Ixodes auritulus*, 2 *Rhipicephalus sanguineus* s. l. y 2 *Amblyomma triste*.

En la siguiente tabla se detalla el total de garrapatas extraídas.

Colectadas de	Especie	Estadio	Pooles	n
Vegetación	<i>Amblyomma aureolatum</i>	Larva	46	368
		Ninfa	-	52
	<i>Amblyomma triste</i>	Hembra	-	1
	<i>Ixodes auritulus</i>	Larva	69	591
		Ninfa	-	14
		Hembra	-	1
Caninos domésticos	<i>A. aureolatum</i>	Macho	-	4
		Hembra	-	83
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Macho	-	1
		Hembra	-	1
	<i>A. triste</i>	Hembra	-	1
			<b>Total</b>	<b>1117</b>

### PCR para detectar el género *Rickettsia*

Una hembra de *A. aureolatum* (colectada de un canino doméstico) (0,1%) resultó positiva mediante la PCR para detectar el género *Rickettsia* (fragmento del espaciador intergénico 23S-5S). El producto amplificado fue secuenciado, resultando en un 99,7% de identidad con distintos hallazgos de *Rickettsia bellii* en Argentina.

Para caracterizar molecularmente el hallazgo se realizaron dos PCRs para fragmentos de los genes *gltA* y *htrA*. Ambas resultaron negativas.

### PCR para detectar los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*

Se realizó la PCR para detectar la familia Anaplasmataceae (fragmento ARNr 16S) resultando positivas 1 ninfa de *I. auritulus* colectada de vegetación (0,1%) y 3 hembras de *A. aureolatum* colectadas de perros (3,4%).

Se secuenciaron todos los productos amplificados. Las tres secuencias obtenidas de *A. aureolatum* tuvieron un 100% de identidad entre sí y 99,7-99,4% con bacterias rickettsiales halladas en diversas especies de garrapatas. La secuencia obtenida de *I. auritulus* tuvo un 100% de identidad con *Ehrlichia* sp. detectada en pingüinos *Spheniscus magellanicus* de Chile (MK049840) e *Ixodes turdus* de Japón (LC386011).

A la muestra positiva de *I. auritulus* se le realizó las PCRs para los genes *dsb* y *groESL* resultando negativas.

### **PCR para detectar el género *Borrelia***

Trece garrapatas colectadas de vegetación resultaron positivas (1,3%) (9/52 (17,3%) ninfas de *A. aureolatum* y 4/14 (28,6%) ninfas de *I. auritulus*) mediante la PCR anidada para detectar el género *Borrelia* (fragmento del gen *fla*).

Todos los productos amplificados pudieron ser secuenciados. Las secuencias obtenidas de los positivos de *I. auritulus* tuvieron 97,9-100% de identidad entre sí y se relacionaron filogenéticamente con *Borrelia* spp. del grupo *B. burgdorferi* s. l. El árbol filogenético generado con las secuencias *fla* mostró que los diferentes haplotipos de *Borrelia* detectados en *I. auritulus* conforman un linaje independiente dentro del complejo *B. burgdorferi* s. l. Estos haplotipos se encuentra muy relacionados con secuencias de *Borrelia* sp. halladas en *I. auritulus* de Canadá (KT827332) y Uruguay (MK160131).

Los hallazgos en *A. aureolatum* tuvieron 100% de identidad entre sí y se relacionaron con *Borrelia* spp. del grupo Reptiles (o tipo fiebre recurrente), conformando un grupo filogenético con *Borrelia turcica* (hallada en *Hyalomma aegyptium* de Turquía) (AB109242) y *Borrelia* spp. detectadas en *Amblyomma maculatum* de EEUU (KF395230) y *A. longirostre* de Brasil (MN064675), y también con una *Borrelia* sp. encontrada en la tortuga *Geochelone pardalis babcocki* de Zambia (AB473529). Todas estas *Borrelia* spp. pertenecen al grupo Reptiles (o tipo Fiebre Recurrente).

## **V. Discusión**

El presente trabajo establece la presencia permanente de al menos dos especies de garrapatas en la RECS: *I. auritulus* y *A. aureolatum*. Respecto a la importancia en salud pública, *A. aureolatum* es vector de *R. rickettsii* en Brasil, mientras que *I. auritulus* se considera que posee un papel importante en el mantenimiento del ciclo enzoótico de *B. burgdorferi* s.l. y otras especies de borrelias a nivel mundial.

Respecto a los patógenos bacterianos, este es el primer reporte de *Borrelia* sp. en garrapatas *A. aureolatum*. Además, es el tercer reporte de *Borrelia* spp. en *I. auritulus* de Sudamérica (y el primero en Argentina). El hallazgo de genoespecies pertenecientes al grupo de la enfermedad de Lyme en *I. auritulus*, si bien implica la circulación de estas bacterias en la región, se debe considerar que *I. auritulus* parasita a las aves y no se ha registrado picando a humanos. Por otra parte, la especie de *Borrelia* hallada en *A. aureolatum* y el grupo filogenético de borrelias relacionadas son de patogenicidad desconocida para el humano, aunque hay que destacar que *A. aureolatum* pica a los humanos.

Se reporta el primer hallazgo de *R. bellii* en *A. aureolatum* de Argentina. *Rickettsia bellii* es una rickettsia simbiote (hallada en numerosas especies de garrapatas e insectos) y que no ha sido relacionada con enfermedad humana o animal.

Y se reporta el primer hallazgo de *Ehrlichia* sp. en *I. auritulus* a nivel mundial, esta especie de *Ehrlichia* es de patogenicidad desconocida dado que los escasos antecedentes son muy recientes.

Los novedosos hallazgos de bacterias de los géneros *Borrelia*, *Rickettsia* y *Ehrlichia* plantean la necesidad de mantener y profundizar el estudio de las garrapatas y los patógenos asociados en la RECS, tanto en dichos artrópodos como en animales hospedadores donde estas bacterias podrían amplificarse.

## ABSTRACT

The aim was to study epidemiological aspects of ticks and tick-borne microorganisms in the Reserva Ecológica Costanera Sur of Buenos Aires city between 2011 and 2018.

One thousand ninety ticks were collected from vegetation (454 of the species *Amblyomma aureolatum*, 635 *Ixodes auritulus* and 1 *Amblyomma triste*) and 90 from dogs (87 *A. aureolatum*, 2 *Rhipicephalus sanguineus* and 1 *A. triste*). The present study establishes the permanent presence of at least two species of ticks in the RECS: *I. auritulus* and *A. aureolatum*. A prominent role have the specie that bite humans: *A. aureolatum*.

By PCR, 0.1% were positive to the *Rickettsia* genus, 0.3% to the Anaplasmataceae family and 1.2% to the *Borrelia* genus.

This is the first report of *Borrelia* sp. in ticks *A. aureolatum*. In addition, it is the third report of *Borrelia* spp. in *I. auritulus* of South America (and the first in Argentina). The existence of a new species of *Borrelia* in *A. aureolatum* is of relevance since this tick infests dogs and humans, although the phylogenetic group to which it belongs is of unknown pathogenicity. On the other hand, the *Borrelia* spp. detected in *I. auritulus* belong to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group, but this tick species is specific to birds, so the risk of transmission to humans is low.

Furthermore, the first finding of *R. bellii* is reported in *A. aureolatum* of Argentina. *Rickettsia bellii* is a rickettsia symbiote (found in numerous species of ticks and insects) and has not been related to human or animal disease. And the first finding of *Ehrlichia* sp. in *I. auritulus* worldwide, this species of *Ehrlichia* is of unknown pathogenicity given that the poor history is very recent.

# HIPERACTIVIDAD HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-ADRENAL Y FUNCIÓN MNÉSICA EN EL ENVEJECIMIENTO. ESTUDIO NO INVASIVO

Cardoso EML1, Arregger AL1,2, , Sanchez R1, Saglio ML3, Salutto V3, Contreras LN1.

Departamento de Endocrinología Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA\_ CONICET1,2 y Servicio de Neurología, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA3

## **Síntesis**

### **Introducción**

Se describe que durante el proceso de envejecimiento la exposición acumulativa a diferentes estresores pueden con el tiempo alterar la regulación dinámica del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. La incapacidad para frenar adecuadamente la secreción aumentada de cortisol al final del estrés puede ser tan deletérea como la inhabilidad para iniciar apropiadamente la secreción del glucocorticoide cuando aparece el estresor. Ha sido demostrado en adultos sanos el incremento de cortisol en respuesta a situaciones estresantes de la vida cotidiana o inducidas experimentalmente. Entonces, aunque el cortisol permite a una persona responder a los factores de estrés aportando energía y agilidad mental, la elevación crónica de cortisol ha sido implicada en la patogénesis de desórdenes psiquiátricos y somáticos incluyendo depresión, obesidad, enfermedad cardiovascular, diabetes y osteoporosis. El cortisol salival (SAF) refleja la fracción biológicamente activa del cortisol circulante y en la práctica clínica es utilizado en el estudio de la función adrenal. Al ser un biomarcador que permite realizar en forma ambulatoria y no invasiva la evaluación adrenal, es de elección para el estudio del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA) en la población añosa.

El envejecimiento normal está asociado con cambios en el cerebro, que incluyen atrofia neuronal y daño de las subregiones del hipocampo involucradas en el procesamiento de la memoria episódica. El recuerdo de eventos recientes y el aprendizaje de nuevas asociaciones complejas está comprometido. El hipocampo es la zona del sistema límbico que presenta mayor número de receptores a glucocorticoides. La exposición a altas dosis de glucocorticoides se asoció a alteraciones de la función cognitiva y atrofia hipocampal. Ha sido descrito que el genotipo de apolipoproteína E (ApoE) participa en los efectos adversos del estrés sobre el cerebro durante el envejecimiento. En humanos los tres alelos que codifican para ApoE son E2, E3 y E4, siendo E3 el más frecuente en la población y E4 el alelo asociado a desarrollo de Enfermedad de Alzheimer.



Resulta interés entonces la investigación de la asociación entre la actividad HPA, la memoria y distintos genotipos de ApoE en adultos mayores no dementes.

## Objetivos

En este estudio se evaluó el estilo de vida, la memoria y la regulación del mecanismo de retrocontrol negativo del cortisol sobre el eje HPA utilizando la prueba de supresión oral nocturna con dexametasona (DST) en mujeres adultas mayores que manifestaban olvidos.

## Sujetos y Métodos

Se entrevistaron 70 mujeres post menopáusicas, en edades de 65 a 87 años, que manifestaban olvidos frecuentes durante el interrogatorio en la consulta endocrinológica realizada en el Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari. Treinta pacientes con examen neurológico normal y eutiroides clínica y bioquímicamente (TSH:  $2,10 \pm 1,35$  UI) reunían los criterios de inclusión para participar del estudio cuyo protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del IDIM A. Lanari. Veintiocho pacientes completaron el estudio. En todos los casos se obtuvieron muestras de saliva para evaluar el ritmo diario de cortisol salival (SAF) a las 8,0 (SAF<sub>8</sub>), 16,0 (SAF<sub>16</sub>) y 23,0 horas (SAF<sub>23</sub>) y saliva matutina en condiciones estériles para determinación de genotipo ApoE. La sensibilidad del eje HPA se evaluó con DST (utilizando 0,5 mg de dexametasona oral nocturna). SAF y dexametasona salival (Sa-Dex) después de DST se determinaron a las 8,0 (SAF<sub>8dex</sub>, Sa-Dex<sub>8</sub>) y a las 16,0 horas (SAF<sub>16dex</sub>, Sa-Dex<sub>16</sub>). Se consideraron los siguientes valores de referencia de nuestro laboratorio: SAF<sub>8</sub> ≤ 18,0 nM, SAF<sub>16</sub> ≤ 6,0 nM, SAF<sub>23</sub> ≤ 3,8 nM; SAF<sub>8dex</sub> y SAF<sub>16dex</sub> ≤ 2,0 nM y Sa-Dex ≥ 0,229 nM. El estilo de vida (ES), el estrés percibido (EP) y la calidad de vida (QL) fueron evaluados por cuestionarios auto-administrados (ES, SSP-10 y SF-36 respectivamente). Se evaluaron la memoria, la percepción visoespacial y la atención utilizando una batería específica de tests neurocognitivos. SAF (nM) y Sa-Dex (nM) se determinaron por RIA y ELISA, respectivamente y el genotipo de ApoE por PCR. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS ( $p < 0,05$  se consideró significativo).

## Resultados

### *Supresibilidad con 0,5 mg de dexametasona oral nocturna y secreción diaria de cortisol salival*

Tres de 28 mujeres no suprimieron (grupo Sup<sup>-</sup>) el cortisol salival a las 8,0 y 16,0 hs (SAF<sub>8dex</sub>:  $10,6 \pm 6,8$  nM y SAF<sub>16dex</sub>:  $4,2 \pm 1,3$  nM) luego de la administración de 0,5 mg de dexametasona oral nocturna. En tanto, 25 mujeres suprimieron (grupo Sup<sup>+</sup>) adecuadamente (SAF<sub>8dex</sub>:  $0,7 \pm 0,3$  nM y SAF<sub>16dex</sub>:  $0,7 \pm 0,2$  nM). La diferencia de SAF<sub>8dex</sub> y SAF<sub>16dex</sub> fue estadísticamente significativa entre supresoras y no supresoras ( $p = 0,0053$  para ambos analitos).

Las concentraciones de SAF matutino ( $9,8 \pm 4,5$  nM); vespertino ( $3,8 \pm 1,2$  nM) y nocturno ( $2,3 \pm 1,5$  nM) en  $\text{Sup}^-$  fueron similares al grupo  $\text{Sup}^+$  ( $8,0 \pm 2,9$  nM;  $2,7 \pm 0,6$  nM y  $1,2 \pm 0,9$  nM, respectivamente;  $p \geq 0,09$ ). En  $\text{Sup}^+$  se demostró presencia de variación circadiana de cortisol en saliva, siendo el  $\text{SAF}_{23}$  significativamente menor que  $\text{SAF}_8$  y  $\text{SAF}_{16}$  ( $p = 0,0001$ ). En  $\text{Sup}^-$ , la variación circadiana de cortisol salival estuvo presente ( $\text{SAF}_{23}$  fue  $\leq 50\%$  de  $\text{SAF}_8$ ), sin embargo la concentración de  $\text{SAF}_{23}$  no fue significativamente menor a la obtenida a las 16,0 hs ( $p \geq 0,06$ ). La pendiente de caída de la secreción de cortisol resultó significativamente menor en  $\text{Sup}^-$  (coeficiente de la pendiente  $\pm$  ES:  $-1,17618 \pm 0,36868$ ) respecto de  $\text{Sup}^+$  (coeficiente de la pendiente  $\pm$  ES:  $-1,47726 \pm 0,11844$ ),  $p < 0,0001$ . Además, en el grupo  $\text{Sup}^-$   $\text{SAF}_8$  y  $\text{SAF}_{16}$  basales no fueron diferentes a las concentraciones obtenidas a las 8,0 y 16,0 h post dexametasona ( $p \geq 0,71$ ). Sin embargo, en el grupo  $\text{Sup}^+$  los cortisoles salivales post dexametasona ( $\text{SAF}_8$  y  $\text{SAF}_{16}$ ) fueron significativamente menores a los basales ( $p = 0,0001$ ). En el Grupo  $\text{Sup}^-$  la concentración de dexametasona salival a las 8,0 horas ( $\text{Sa-Dex}_8$ :  $0,87 \pm 0,14$  nM) y 16 horas ( $\text{Sa-Dex}_{16}$ :  $0,37 \pm 0,17$  nM) fueron semejantes a las obtenidas en el grupo  $\text{Sup}^+$  ( $1,0 \pm 0,53$  y  $0,52 \pm 0,30$ , respectivamente;  $p > 0,577$  en todos los casos) siendo en ambos grupos  $\text{Sa-Dex}_{16}$  significativamente menor a  $\text{Sa-Dex}_8$  ( $p \leq 0,02$ , en todos los casos). En  $\text{Sup}^+$  y  $\text{Sup}^-$  las concentraciones de cortisol salival basales y post dexametasona no se correlacionaron significativamente con la edad ( $p \geq 0,160$  en todos los casos). Esta ausencia de correlación también se demostró al analizar las concentraciones de dexametasona salival obtenidas a las 8,0 y 16,0 horas en DST ( $p \geq 0,150$  en todos los casos).

#### *Calidad de vida, estrés percibido y estilo de vida*

No hubo diferencias significativas en el componente físico (CSF) ni en el componente mental (CSM) del cuestionario SF-36 entre las pacientes del grupo  $\text{S}^+$  ( $46,59 \pm 7,65$  y  $47,54 \pm 8,39$ ; respectivamente) y las del grupo  $\text{S}^-$  ( $43,2 \pm 6,07$  y  $47,83 \pm 3,821$ ; respectivamente);  $p = 0,2347$  y  $p = 0,8410$  para  $\text{S}^+$  y  $\text{S}^-$ , respectivamente. Así mismo no hubo diferencias en el estrés percibido (valoración positiva y negativa) entre las pacientes del grupo  $\text{Sup}^+$  ( $4,556 \pm 2,706$  y  $8,056 \pm 4,007$ ; respectivamente) y del grupo  $\text{Sup}^-$  ( $4,667 \pm 2,887$  y  $8,667 \pm 2,082$ ; respectivamente);  $p = 0,8016$  y  $0,9599$  para valoración positiva y negativa, respectivamente.

El índice del estilo de vida en el grupo  $\text{Sup}^-$  ( $3,7 \pm 0,6$ ) fue significativamente menor con respecto al grupo  $\text{Sup}^+$  ( $4,8 \pm 0,6$ ),  $p = 0,02$ ; observándose menor vincularidad social en  $\text{Sup}^-$  respecto a  $\text{Sup}^+$ . No se encontraron diferencias significativas entre los grupos relacionadas con la actividad laboral y las dificultades financieras.

#### *Genotipo de ApoE*

En la población de estudio el genotipo 3,3 fue el más frecuente (67,0% casos), luego el 3,4 (21,0% casos) y 2,3 (12,0% casos). En el grupo  $\text{Sup}^-$  estuvieron presentes los tres genotipos, por lo cual no hubo correlación entre la ausencia de supresión del eje HPA y el genotipo de ApoE.

#### *Evaluación Neurocognitiva*

En quince pacientes la evaluación neurocognitiva fue normal, en tanto en otros trece casos se obtuvo un perfil cognitivo compatible con déficit cognitivo leve (DCL). El déficit cognitivo fue en 6 casos a predominio mnésico (DCL<sub>mne</sub>), en 6 casos atencional

(DCLat) y en 1 caso atencional-ejecutivo (DCLat-ej). En DCL mne sólo las tres pacientes del grupo Sup<sup>-</sup> demostraron rendimiento inadecuado en Prueba Auditiva Verbal de Rey (RAVLT): spam inmediato en condiciones de sobrecarga (SI), lista 5 A (L5), aprendizaje (AP) y lista 7 A (L7). En una paciente de este grupo el reconocimiento (REC) también fue inadecuado. Las restantes DCLmne (3 casos) pertenecientes al grupo Sup<sup>+</sup> no mostraron un patrón de desempeño homogéneo descrito en RAVLT. En dos de las pacientes Sup<sup>-</sup> la resonancia de la región unco-amigdalina encefálica evidenció dilatación de la prolongación esfenoïdal del ventrículo lateral izquierdo en relación a su homólogo. Esta observación se interpretó como leve atrofia hipocampal izquierda.

## Discusión

Se demostró que 3 de las 28 mujeres estudiadas evidenciaron trastornos de la sensibilidad del eje HPA al no suprimir adecuadamente la secreción de cortisol salival ante la administración de baja dosis de dexametasona oral nocturna. La supresión inadecuada fue descrita en fumadores, en sujetos con estado sueño-vigilia alterados y menor vitalidad. En nuestro estudio estos factores fueron excluidos dado que ninguna paciente Sup<sup>-</sup> (n:3) eran fumadoras y todas refirieron un ritmo sueño-vigilia conservado (período sueño  $\geq 6$  horas). Debido a que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de dexametasona salivales alcanzadas entre las mujeres que suprimieron adecuadamente (Sup<sup>+</sup>) y las no supresoras (Sup<sup>-</sup>), se excluyó compromiso de la biodisponibilidad de la dexametasona. Se observó en el grupo Sup<sup>-</sup> aplanamiento de la pendiente de cortisol salival a lo largo del día, significativamente menor a la hallada en Sup<sup>+</sup>, lo que indicaría un estado de hiperactividad del eje HPA sostenida. Todos los Sup<sup>-</sup> suprimieron cortisol salival adecuadamente con 1 mg de dexametasona oral nocturna.

Respecto a la calidad de vida, no hubo diferencias entre los componentes físico y mental entre Sup<sup>+</sup> y Sup<sup>-</sup> así como en la valoración positiva y negativa del estrés percibido por cada grupo. El índice de estilo de vida evidenció disminución significativa de los vínculos sociales en Sup<sup>-</sup> asociado a sentimiento de soledad. Ambos grupos eran similares en su condición socioeconómica. Esta influencia emocional negativa podría inducir la desregulación del eje HPA tal como fue sugerido por otros autores. El afrontamiento de la emoción y la recuperación de los vínculos sociales contribuirían a la resiliencia de la afectación, pudiendo ser de este modo un estadio transitorio durante el envejecimiento pausable de recuperación.

El genotipo de ApoE más frecuente fue el 3,3 (67% de los casos), como se describe en la población general caucásica. El 3,4 sólo estuvo presente en el 21 % de los casos seguido por el 2,3 (12%). El genotipo de ApoE no diferenció Sup<sup>+</sup> de Sup<sup>-</sup>.

La evaluación neurocognitiva fue normal en el 54,0 % de las mujeres. En el 46,0 % restante se definió déficit cognitivo mnésico en 6 casos, atencional en 6 casos y atencional ejecutivo en 1 caso. Todas las pacientes Sup<sup>-</sup> tuvieron DCLmnésico con un patrón de RAVLT inadecuado en cuatro áreas (SI, L5, AP y L7) a diferencia del resto DCLmne. En una paciente de este grupo el REC también fue inadecuado. En dos de las pacientes Sup<sup>-</sup> la resonancia de la región unco-amigdalina encefálica evidenció dilatación de la prolongación esfenoïdal izquierda en relación a su homólogo. Esta observación se

interpreta como leve atrofia hipocampal izquierda. Los resultados apoyan el concepto de que la falta de inhibición de la dexametasona sobre HPA expresa un estado de hipercortisolemia subclínica sostenida con efecto deletéreo sobre el SNC y área hipocampal, esta última sustrato anatómico de la memoria episódica. Este circuito patológico en los adultos mayores podría ser iniciado y perpetuado en el tiempo en respuesta a la injuria emocional causada por el aislamiento social y sensación de soledad expresado en el estudio.

En conclusión, en mujeres adultas mayores con deterioro mnésico leve la evaluación de la sensibilidad del eje HPA con dosis baja de dexametasona constituiría un abordaje práctico, económico y no invasivo, útil para la detección precoz de compromiso hipocampal.

## ABSTRACT

Lifestyle, memory and the HPA axis feedback regulation in aging women were evaluated. Twenty eight 65-87 y/o women complaining of poor memory were studied. They obtained whole saliva samples to assess the daily rhythm of salivary cortisol (SAF) at 8.00 (SAF<sub>8</sub>), 16.00(SAF<sub>16</sub>) and 23.00 H (SAF<sub>23</sub>) and ApoE genotype . The sensitivity of the HPA axis was assessed by the overnight 0.5 mg dexamethasone suppression test (DST). SAF and salivary dexamethasone (Dsa) after DST were determined at 8.00 (SAF<sub>8dex</sub>, Dsa<sub>8</sub>) and at 16.00 (SAF<sub>16dex</sub>, Dsa<sub>16</sub>). Reference values from our laboratory are: SAF<sub>8</sub> ≤ 18.0 nM, SAF<sub>16</sub> ≤ 6.0 nM, SAF<sub>23</sub> ≤ 3.8 nM; SAF<sub>8dex</sub> and SAF<sub>16dex</sub> ≤ 2.0 nM. Perceived stress (PS), lifestyle (LS), and quality of life (QL) were evaluated by self-administered questionnaires. Memory, visuospatial perception and attention were assessed. SAF (nM) and Dsa (nM) were determined by RIA and ELISA, respectively and ApoE genotype by PCR. Statistics were performed by SPSS (p <0.05 was considered significant). Three patients did not suppress salivary cortisol (Sup<sup>-</sup>) at 8.00 and 16.00 H (SAF<sub>8dex</sub> 10.6±6.8nM and SAF<sub>16dex</sub> 4.2±1.3nM); while 25 suppressed normally (Sup<sup>+</sup>). Dsa was not different between both groups. SAF diurnal variation was normal in all, although the slope was significantly less steep in Sup<sup>-</sup> (p<0.0001). Sup<sup>-</sup> was not related to any ApoE genotype. Lifestyle index was significantly lower in Sup<sup>-</sup> than in Sup<sup>+</sup>, p=0.02, with not differences in QL and PS. Thirteen out of 28 patients showed mild cognitive impairment (MCI). Among the MCI patients only the Sup<sup>-</sup> group had inadequate performance in 4 sections of the Rey Auditory Verbal Learning Test. Brain RMN performed in 2 Sup<sup>-</sup> showed enlargement of the sphenoidal extension of the lateral left ventricle that could be related to shrinkage of the ipsilateral medial temporal lobe. These findings suggest that DST might become a non-invasive approach to detect hippocampal damage in aging women with MCI.

# ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL FLUORURO Y EL MPF EN DENTÍFRICOS Y SU RELACIÓN AL CONTENIDO DE OTROS COMPUESTOS

Cornaglia, María Virginia

Institución: Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas.  
Universidad Nacional de Rosario

## Introducción

El flúor es el elemento más electronegativo de la Tabla Periódica y por lo tanto sólo se lo puede hallar en la naturaleza en el estado de fluoruro ( $F^-$ ). El fluoruro ha sido utilizado durante décadas bajo diferentes formas químicas en dentífricos, barnices, colutorios y comprimidos, a fin de aportar fluoruro en forma tópica o sistémica, con el objetivo de prevenir la aparición de caries dentales (<sup>i,iii</sup>). Si bien el tema es controvertido, habiendo evidencias en contra del uso del fluoruro, por la posibilidad de aparición de fluorosis en sus diferentes manifestaciones, se utiliza aún en las preparaciones mencionadas y como recurso para la fluoración de aguas de consumo.

El fluoruro de sodio (NaF) y el monofluorofosfato (MFP) son las dos drogas más utilizadas que contienen fluoruro, en la composición de pastas dentales. Es conocido que el MFP es una droga de estabilidad limitada, especialmente en medios acuosos y con pH bajo (<sup>iii</sup>), sin embargo, no existen reportes sobre inestabilidad de las preparaciones con NaF. Experimentos conjuntos realizados en la Facultad de Odontología de San Pablo, Baurú, Brasil, y en el Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Medicina, Rosario evidenciaron cambios en la biodisponibilidad del fluoruro en dentífricos con NaF y MFP (experimentos exploratorios no publicados). El hallazgo es interesante de investigar dado que los dentífricos pueden tener largos tiempos de almacenamiento en depósitos o estanterías y aún en los domicilios de acuerdo al uso por cada persona.

El esquema siguiente muestra las posibles vías por las cuales podría el fluoruro y el MFP perder disponibilidad. El MFP o el  $F^-$  podría reaccionar con algún otro componente de la pasta formando compuestos no descriptos aún. Por otra parte el fluoruro podría reaccionar

con los protones del medio (especialmente en aquellas pastas con pH bajo) formando HF. Este ácido podría difundir al exterior del contenedor por difusión debido a su bajo punto de ebullición (19 °C). Otra vía posible podría ser la reacción con el aluminio de la cubierta del pomo contenedor.

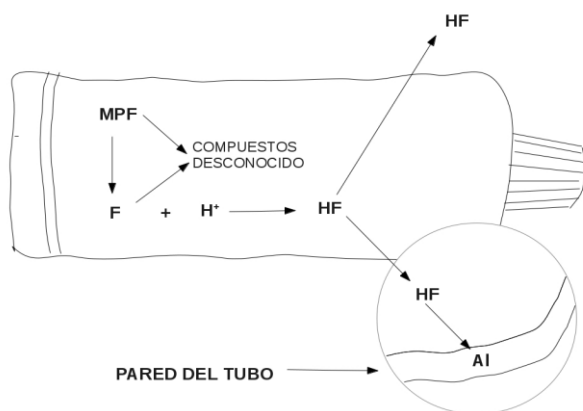


Figura 1: representación esquemática de las posibles vías de pérdida de flúor a partir del fluoruro de sodio y el MPF

## OBJETIVO GENERAL

Contribuir en el estudio de la estabilidad del fluoruro y MFP en pastas dentales y su relación con el contenido de otras sustancias presentes.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Evaluar la variación del contenido de fluoruro y MFP a lo largo del tiempo en pastas dentales.
- 2- Investigar la pérdida de ácido fluorhídrico (HF) y su relación con el pH de la pasta.
- 3- Investigar la pérdida de flúor por reacción con el abrasivo de la pasta dental.
- 4- Evaluar la distribución de los principios activos (NaF y MFP) en pastas
- 5- Investigar la pérdida de flúor de la pasta dental por la reacción con la cubierta del contenedor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló utilizando dentífricos con la siguiente composición:

Dentífrico A - Fluoruro de sodio 1500 ppm, abrasivo: sílica.

Dentífrico B - MFP 1500 ppm, abrasivo: sílica.

Dentífrico C - MFP 1500 ppm, abrasivo: carbonato de calcio-

A continuación se describen los experimentos realizados para dar cumplimiento a los objetivos específicos planteados y luego de dicha descripción se dan detalles de las técnicas utilizadas en cada experimento.

Experimento para dar cumplimiento al objetivo 1: *Evaluar la variación del contenido de fluoruro a lo largo del tiempo en pastas dentales.*

Se mantuvieron pastas dentífricas de cada tipo en sus contenedores habituales, durante 7 meses a temperatura ambiente, simulando almacenamiento en establecimiento de fabricación, puesto de venta o domicilio. De cada pasta se extrajo una alícuota de 200 mg cada 7-15 días las cuales se colocaron en tubos plásticos rotulados. La alícuota se disolvió en agua destilada y se ajustó a un volumen final 10 ml. La solución resultante se centrifugó a 1000 xg para separar solución de precipitado. A cada tiempo y para cada dentífrico la medición se realizó por duplicado.

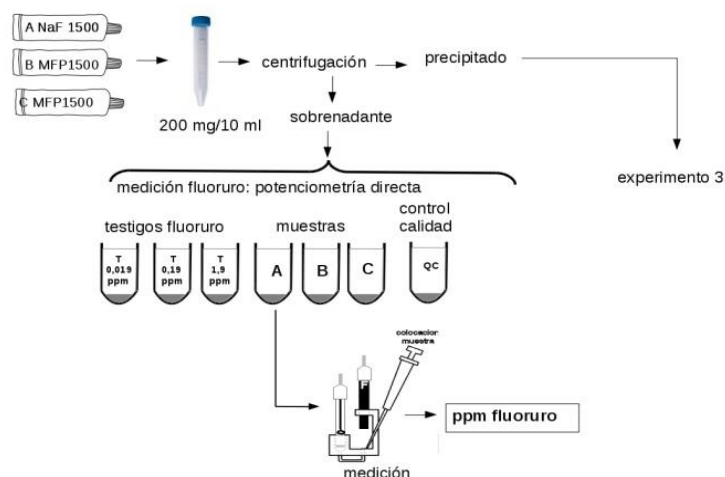


Ilustración 2: Representación esquemática de los procedimientos detallados en Experimento 1

El precipitado se lavó con agua destilada y se reservó para analizar el flúor en el abrasivo (experimento 3) y en la solución se realizó la medición de fluoruro por potenciometría directa. Dicha técnica se detalla más abajo. La ilustración 2 muestra los procedimientos del experimento 1 de manera esquemática.

Experimento para dar cumplimiento al objetivo 2: *Investigar la pérdida de ácido fluorhídrico (HF) y su relación con el pH de la pasta.*

La investigación de la pérdida de flúor como ácido fluorhídrico se realizó como se describió en trabajos previos [2]. Brevemente, una alícuota de cada dentífrico se colocó en una cámara de destilación isotérmica que contiene la solución para atrapar el HF desprendido. Se prepararon cámaras con alícuotas de cada dentífrico a tiempos sucesivos cada 15 días durante 6 meses, finalmente a los 6 meses se midió el HF desprendido en el sistema creado para atrapar el HF. La cantidad de HF desprendido a lo largo del tiempo se analizó con regresión lineal. El experimento se realizó por duplicado. La ilustración 3 muestra esquemáticamente los materiales y métodos descritos en el párrafo anterior.

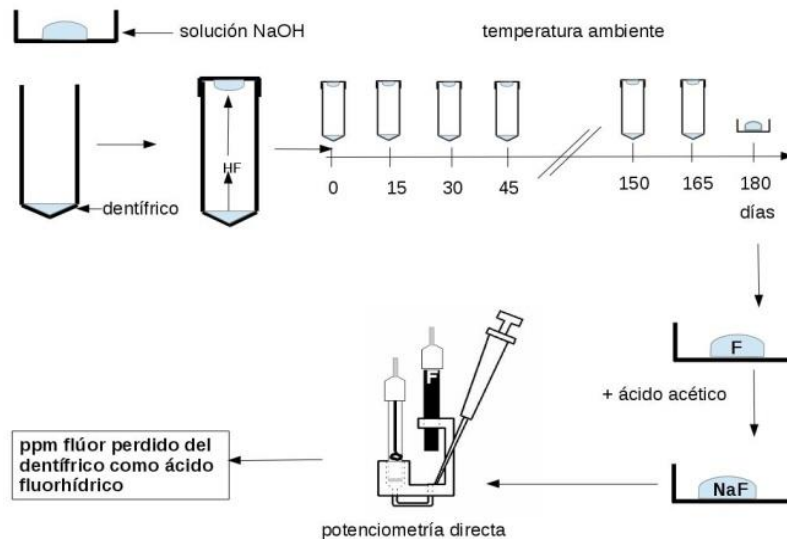


Ilustración 3: Representación esquemática de los procedimientos detallados en Experimento 2

Experimento para dar cumplimiento al objetivo 3: *Investigar la pérdida de flúor por reacción con el abrasivo de la pasta dental.*

En los precipitados obtenidos en el experimento 1 (mayormente compuesto por abrasivos) se determinó el contenido de fluoruro. La medición de flúor se realizó por potenciometría directa post destilación isotérmica. La ilustración 4 muestra esquemáticamente los procedimientos realizados.



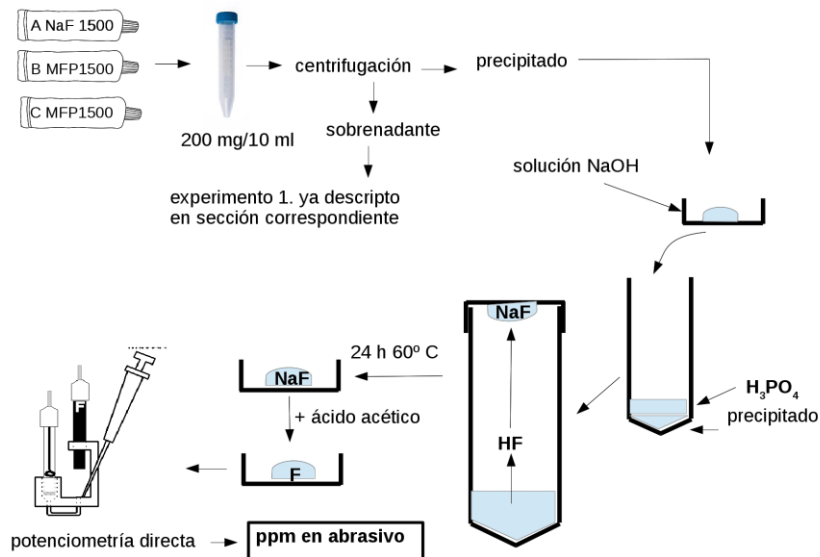


Ilustración 4: Representación esquemática de los procedimientos descritos en experimento 3

El experimento se realizó por duplicado y se midió la concentración de flúor en los precipitados al inicio del experimento y a los 10 meses.

Experimento para dar cumplimiento al objetivo 4: *Evaluar la distribución de los principios activos (NaF y MFP) en pastas*

Las variaciones diarias observadas en el experimento 1 indujeron a pensar que dichos cambios pudieran deberse a una deficiente homogeneización del contenido del dentífrico. Para verificar esta hipótesis, se procedió a cortar de manera longitudinal un contenedor de cada dentífrico con una tijera. Se tomaron 5 muestras de 200mg de dentífrico distribuidas del centro y de los extremos. Luego se procedió a colocar todo el contenido en un vaso de precipitado y mezclar durante unos minutos hasta homogeneizar la pasta con una espátula. A continuación se recolectaron 5 muestras. Se midió fluoruro por potenciometría directa a las 5 muestras sin mezclar y mezcladas. La ilustración 5 esquematiza el procedimiento descrito.

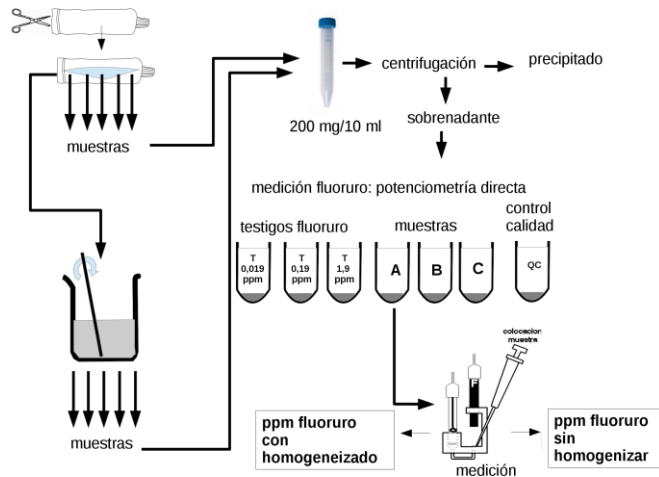


Ilustración 5: Representación esquemática de los procedimientos descritos en Experimento 4 para una pasta dental

Experimento para dar cumplimiento al objetivo 5: *Evaluar la pérdida de principios activos por reacción con la cubierta del pomo contenedor*

Se colocó una alícuota de aproximadamente 10g de cada dentífrico en un tubo de vidrio (V) el cual se cerró herméticamente y otra alícuota en un tubo de plástico (P) cerrado herméticamente. El resto de cada pasta dental se almacenó en su contenedor original (CO). Se midió el contenido de fluoruro en el momento del fraccionamiento y a los 10 meses en V, P y CO. La comparación de las mediciones mencionadas permitió conocer si parte de los principios activos estudiados pasan o no a la estructura del pomo. La ilustración 6 representa el procedimiento realizado

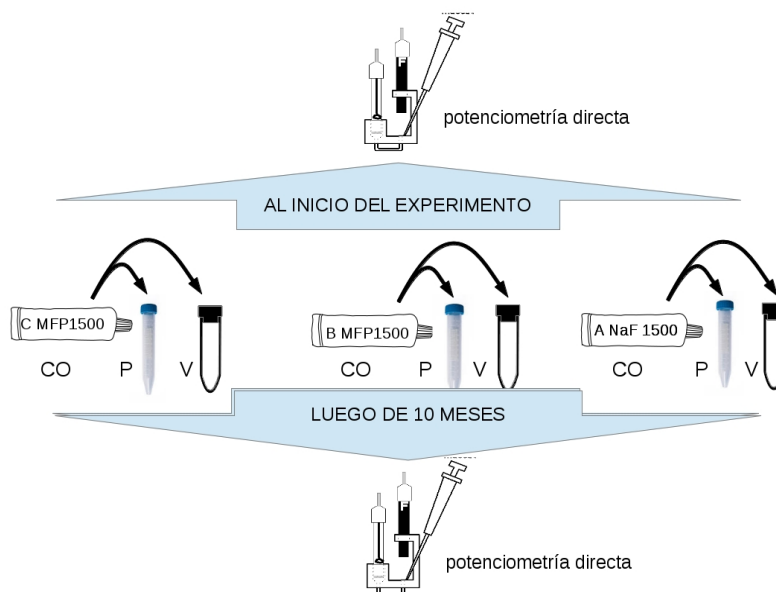


Ilustración 6: Representación esquemática de los procedimientos descritos en Experimento 5

Detalles de las técnicas de medición utilizadas

#### *Medición de fluoruro por potenciometría directa*

La medición se realizó utilizando un electrodo de ion específico ORION 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital. La determinación se basa en la relación lineal existente entre los mV desarrollados por los electrodos y el logaritmo de la concentración de flúor en las muestras o patrones utilizados. Simultáneamente con las muestras se procesan soluciones patrones de NaF de 0,019 -19 ppm. A las muestras y las soluciones patrón se les adiciona un 10 % de buffer ácido acético/acetato de sodio 2 mol/l para ajustar pH a 5.5 y homogeneizar la fuerza iónica de las soluciones.<sup>[1v]</sup> La determinación se realizó por duplicado y estuvo sujeta a control de calidad (ver adelante).

#### *Medición de flúor total por potenciometría post destilación isotérmica*

La determinación se basa en la relación lineal existente entre los mV desarrollados por los electrodos y el logaritmo de la concentración de flúor en las muestras o patrones utilizados. Previo a la determinación potenciométrica el flúor (ver más arriba) fue aislado de las muestras por microdifusión isotérmica, tratando la muestra con ácido fosfórico concentrado durante 24 horas a 60 ° C y recuperando el ácido fluorhídrico desprendido de la muestra sobre 5 ul de NaOH 1.65 N depositado en la tapa de la cámara de destilación. Luego de la destilación isotérmica, la trampa de NaOH se ajustó a pH 5-5,5 con 55 ul de ácido acético glacial diluido 1/60. Simultáneamente con las muestras se procesaron testigos de NaF de concentraciones 0.019-19 ppm. La determinación se realizó por duplicado y estuvo sujeta a control de calidad (ver adelante)

#### *Medición de pH*

El pH fue medido con un pH-metro Metrohm E 632. Para la calibración se utilizaron buffers de pH 7 y 4 para medidas de pH menores a 7 y buffers de pH 7 y 9 para medidas mayores.

Control de calidad de mediciones y análisis estadístico

#### *Control de calidad*

Las determinaciones se realizaron por duplicado y estuvieron sujetas a control de calidad. Si el coeficiente de variación superó el 10% se repitieron las determinaciones. Se procesaron simultáneamente una solución “control de calidad” de concentración conocida y se calcularon las Unidades de desvío estándar (UDS). Se aceptó la determinación si la UDS se encontró dentro del intervalo [-2,2]. El instrumental utilizado estuvo sometido a control de funcionamiento mensual por personal del laboratorio.

#### *Manejo de datos y análisis estadístico*

La recolección de datos se realizó en planillas de cálculo y para el análisis de los datos se utilizó R 3.2.2 [v]. El análisis de las concentraciones de fluoruro a lo largo del tiempo se realizó por regresión lineal. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con análisis de la variancia y post test LSD. Las diferencias se consideraron significativas si  $p < 0,05$ .

#### *Bioseguridad e higiene del trabajo*

Los protocolos que se ejecutaron en este proyecto han sido evaluados tanto en riesgo químico como biológico y se han previsto los posibles accidentes y las precauciones para evitarlos. Todos los equipos utilizados estuvieron sujetos a controles periódicos de funcionamiento.

## **RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

A continuación se muestran los resultados agrupados por experimentos como fue detallado en materiales y métodos.

### *Resultados del Experimento 1*

La ilustración 5 muestra la variación del contenido de fluoruro (en ppm) a lo largo del experimento.

El análisis de regresión lineal de los datos obtenidos para el dentífrico con NaF mostró un decrecimiento del contenido de fluoruro a lo largo del tiempo ( $-0.72 \pm 1.25$  ppm/día  $p < 0.05$ ) y valor inicial que no discrepa del informado por el fabricante ( $1451 \pm 156$  ppm). Los dentífricos con MFP mostraron un contenido inicial de fluoruro que discrepó de cero, B:  $40.5 \pm 4.0$  ppm  $p < 0.05$ , y C:  $118.8 \pm 19.6$  ppm  $p < 0.05$ . El cambio en el contenido de fluoruro a lo largo del tiempo fue B:  $-0.046 \pm 0.032$  ppm/día,  $p > 0.05$  y C:  $0.290 \pm 0.157$  ppm/día,  $p > 0.05$ . Como era de esperar los dentífricos B y C tienen bajo contenido de fluoruro debido a que el principio activo es MFP, sin embargo los resultados indican que parte del MFP se halla hidrolizado a fluoruro en ambos dentífricos como lo evidencia la ordenada al origen de las regresiones lineales para B y C.

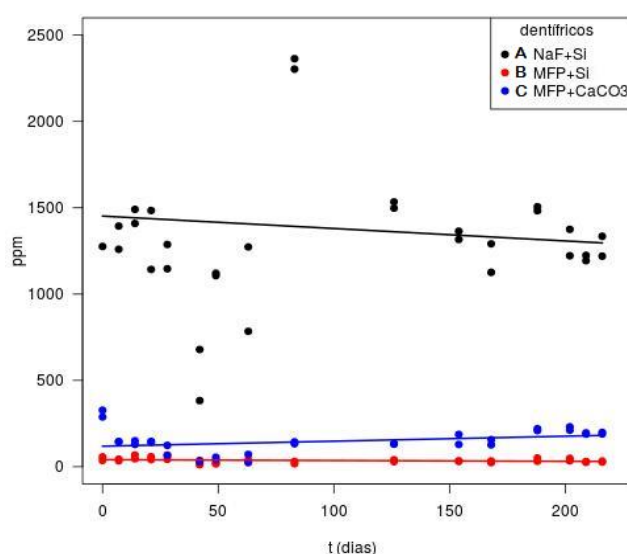


Ilustración 5: Contenido de fluoruro en pastas dentales a lo largo del tiempo. Los puntos indican las medias de las mediciones realizadas por duplicado a cada tiempo y la línea la recta de regresión lineal obtenida con los datos

### Resultados del Experimento 2

La tabla I muestra la velocidad de pérdida de flúor de las pastas dentales en ppm/día y el porcentaje de pérdida que representaría luego de 1 año.

Tabla I. Pérdida de flúor de las pastas dentales en ppm/día y pérdida de flúor de las pastas expresado como porcentaje del valor inicial al cabo de 1 año		
Pasta	Pérdida de flúor, ppm/día	% de pérdida respecto del contenido de flúor al inicio del experimento
A	0,2 ppm/día	4,8
B	0,08 ppm/día	1,9
C	0,03 ppm/día	0,72

El pH de las pastas se midió durante seis meses y no mostró variación a lo largo del tiempo (regresión lineal  $p > 0.05$ ). Sin embargo cuando se compararon los valores de pH de las pasta se halló diferencias significativas entre ellas (ANOVA, LSD tests  $p < 0.05$ ). Siendo el pH de la pasta C significativamente mayor que el de A y B, pudiéndose explicar

la diferencia por el abrasivo que es carbonato de calcio, cuyo anión tiene características básicas. La tabla siguiente muestra los valores de pH para las tres pastas

Tabla II: valores de pH medidos en pastas dentífricas (n=15), media±desvío estándar. Letras distintas de la columna significado entre dos filas indica diferencias significativas (p<0,05) entre los valores de pH de las dentífricos. ANOVA, post test LSD		
pasta	pH	significado
A: NaF 1500 ppm , sílica	5,9±0,6	b
B: MFP 1500 ppm , sílica	5,9±0,6	b
C: MFP 1500 ppm, carbonato de calcio	6,7±0,5	a

Los resultados de pH explican la menor pérdida como HF del dentífrico C. Al poseer un mayor pH la formación de HF sería menor. Por otra parte la menor pérdida de HF del dentífrico B respecto de A, a pesar de tener ambas pastas el mismo pH se explicaría porque la formación de HF se realiza a partir del fluoruro y la pasta B posee MFP como principal componente, siendo el fluoruro un porcentaje bajo de su composición como se demostró en el experimento 1.

### Resultados del Experimento 3

El contenido de flúor en el abrasivo fue comparado entre los tres dentífricos utilizados y comparando el valor al inicio del experimento y luego de 10 meses. Se hallaron diferencias significativas en el contenido de flúor entre los dentífricos (p<0,05), sin hallarse efecto del tiempo (p>0,05, ANOVA a dos criterios). No se evidenció interacción entre los factores tiempo y dentífrico (p>0,05). La tabla III muestra los resultados del experimento

Tabla III. Contenido de flúor en abrasivo a 0 y 10 meses de almacenamiento. Los datos se muestran como media±desvío estándar. (n=2, medidas por duplicado). Todas las letras distintas entre dos celdas indica diferencias significativas p<0,05 LSD. test					
	tiempo		ANOVA DOS CRITERIOS		
	0	10 meses	efecto tiempo	efecto dentífrico	interacción
dentífrico					
A (NaF sílica)	83±105bc	40±20bc	ns	p<0,05	ns
B(MFP sílica)	34±13c	15±10c	ns	p<0,05	ns
C (MFP CaCO <sub>3</sub> )	752±465a	519±681ab	ns	p<0,05	ns

Los resultados indican que la pérdida de fluoruro en el abrasivo es significativamente mayor en el caso que el abrasivo es carbonato de calcio, comparado con la sílica.

### Resultados del experimento 4

La concentración de fluoruro en las pastas dentales antes y después de homogeneizar se analizó aplicando un análisis de la variancia a dos criterios (pasta dental: A, B y C, homogeneización: no -si). La concentración de fluoruro en la pasta dependió del tipo de pasta (p<0,05) y de la homogeneización (p<0,05), hallándose una interacción

significativa entre el tipo de pasta y el proceso de homogeneización. La concentración de fluoruro de la pasta A difirió significativamente para el dentífrico A antes y después de homogeneizar. La tabla IV muestra resume los resultados del análisis.

Tabla IV: concentración de fluoruro (media±desvío estándar, n=5 por grupo)de las pastas dentales antes y después del homogeneizado. Todas las letras distintas entre dos celdas indica diferencias significativas  $p < 0,05$  LSD. test.

	homogeneizado		ANOVA A DOS CRITERIOS		
	no	si	homogeneizado	pasta	interacción
A (NaF silica)	1539±218a	1090±145b	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
B(MFP silica)	13±7c	13±6c	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
C (MFP CaCO <sub>3</sub> )	117±23c	142±28c	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Se puede observar además una mayor variancia en los resultados de fluoruro sin homogeneizar. Sin embargo al comparar las variacias, si bien la variancia de la concentración de fluoruro en el dentífrico A antes de homogenizar fue 2.3 veces mayor que luego de homogeneizar, la diferencia entre las variancias no fue significativa (var.test  $p > 0,05$ )

#### Resultados del experimento 5

Se analizó la variación de la concentración de fluoruro en las pastas dentales mantenidas en su contenedor original con aquellas conservadas en tubos de plástico o vidrio durante 10 meses. Se aplicó un análisis de la variancia a tres criterios (dentífrico: A, B y C; tiempo: 0 y 10 meses, contenedor: CO (original), V (tubo vidrio), P (tubo plástico).

Se halló efecto significativo del dentífrico sobre la concentración de fluoruro, coincidente con lo observado en el experimento 1, pero no se halló efecto del contenedor utilizado ni del tiempo. Tampoco se halló interacción entre los factores estudiados. La tabla V muestra los valores hallados.

Tabla V: Contenido de fluoruro (media±desvío estándar) en dentífricos conservados en diferentes contenedores durante 10 meses. Se evaluó el efecto del dentífrico, contenedor y tiempo sobre el contenido de fluoruro, ANOVA 3 criterios.

	A		B		C		dentífrico: $p < 0,05$
	0	10	0	10	0	10	tiempo: $p > 0,05$
CO	1772±1026	1835±717	42±9	58±9	210±90	180±27	
V	1772±1026	1722±877	42±9	33±9	210±90	189±21	
P	1772±1026	1815±690	42±9	25±1	210±90	209±21	
contenedor $p > 0,05$							

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos aportan evidencia en favor de la hipótesis planteada respecto de la estabilidad del fluoruro en las pastas dentales. Las observaciones preliminares que indicaban una pérdida de fluoruro a lo largo del tiempo, quedan parcialmente justificadas por los resultados obtenidos, aunque los mismos merecerían estudios a mayor tiempo y con mayor número de datos, además de la concreción de otros estudios planteados a futuro (ver abajo).

El dentífrico que contiene NaF y sílica como abrasivo muestra una disminución del contenido de fluoruro a lo largo del tiempo, que si bien no es estadísticamente significativa (regresión lineal), sí es biológicamente significativo si se analiza la cantidad perdida en un año respecto de su contenido inicial. Este dentífrico tuvo al inicio del estudio un contenido coincidente por lo detallado por el fabricante (aprox. 1500 ppm). La pérdida de fluoruro del mismo fue de 0.72 ppm/día, lo que equivaldría a aproximadamente a 300 ppm al año, es decir un 20 % de su total. Con respecto a los dentífricos con MFP no es posible predecir la pérdida de dicho compuesto dado que en este trabajo sólo se midió fluoruro. Sin embargo, los resultados indicarían que el dentífrico C estaría perdiendo parte de su MFP por hidrólisis a fluoruro, evidenciado por aumento de este compuesto a lo largo del tiempo. El dentífrico B al tener una pendiente negativa permite inferir una mayor estabilidad del MFP que en el caso C. Los valores iniciales de fluoruro de B y C estarían indicando que ya al inicio algo del MFP se halla hidrolizado.

Los resultados obtenidos en el experimento 2 justifican en parte la disminución del contenido de fluoruro. Sin embargo como se mostró en la tabla 1, la pérdida por esta vía en el caso del NaF sería del 4,8% cuando la pérdida total alcanzaría aprox. 20%. Esto estaría indicando que la pérdida como HF no sería la única vía. Por otra parte los dentífricos con MFP tienen una menor pérdida como HF, explicable en parte porque el MFP en medio ácido no genera compuestos volátiles y solo lo hace el fluoruro libre, que como lo indica el experimento 1, es bajo comparado con el dentífrico con NaF.

El experimento que muestra flúor ligado a los abrasivos muestra a esta vía como otra forma de pérdida de fluoruro de la pasta. Es llamativa la mayor cantidad de flúor ligado al abrasivo en el compuesto con MFP y carbonato de calcio, que alcanza 8 a 10 veces las de las otras dos pastas. Esta mayor cantidad de flúor sobre el carbonato se explicaría por la afinidad del fluoruro por el calcio. El resultado indicaría que la utilización de este abrasivo sería desaconsejada por su efecto negativo en la disponibilidad de flúor.

Los experimentos descriptos en este trabajo también han demostrado que la distribución del fluoruro en la pasta original es heterogénea y que se podría atribuir a un defecto en el mezclado de los componentes a la hora de la preparación. Este resultado pudo verificarse para la pasta A que contiene NaF pero no para las otras. Esta diferencia podría explicarse porque en este trabajo solo se midió fluoruro y no MFP.

Por último los resultados de los experimentos destinados a demostrar pérdida de fluoruro por reacción con la cubierta del contenedor, indicarían que esta vía es despreciable. No se hallaron diferencias entre el contenido de fluoruro de las pastas independientemente del contenedor utilizado.

En su conjunto los resultados de este trabajo indicarían que el contenido de fluoruro desciende a lo largo del tiempo, pero dicho descenso no se explicaría en su totalidad por la pérdida como ácido fluorhídrico o reacción con el pomo contenedor, aunque en gran parte podría explicarse por la unión del flúor al carbonato de calcio, en el dentífrico que lo contiene. Los resultados permiten concluir que al menos para la pasta con NaF el proceso de homogeneización no es completo, hecho que podría determinar una exposición a concentraciones de fluoruro cambiante a lo largo del uso del tubo.

## Abstract

Sodium fluoride (NaF) and monofluorophosphate (MFP) are two drugs that make up toothpastes. It is known that the MFP is of limited stability in aqueous media and with low pH, however, there are no reports of instability of NaF, which is interesting to investigate since dentifrices can have long periods of storage in warehouses and private homes. **Objectives:** to evaluate the variation of the content of fluoride and MFP over time in toothpastes, investigate the loss of hydrofluoric acid (HF) and its relationship with the pH of the paste, investigate the loss of fluoride by reaction with the abrasive of Toothpaste, evaluate the distribution of active ingredients in pastes, and investigate the loss of fluoride from toothpaste by reaction with the container cover. **Materials and methods:** The work was developed using dentifrices with the following composition: Toothpaste A - NaF 1500 ppm, abrasive: silica. Toothpaste B - MFP 1500 ppm, abrasive: silica. Toothpaste C - MFP 1500 ppm, abrasive: calcium carbonate. From each fluoride content was measured every 7-15 days, an aliquot was placed in an isothermal distillation chamber to trap the detached HF and the pH was measured. Fluoride was measured by direct potentiometry in dentifrice knobs with their unmixed and mixed contents; and also after 10 months of storage in glass, plastic and original container. **Results:** the fluoride decreases over time, but this decrease would not be fully explained by the loss as hydrofluoric acid or reaction with the container knob, although in large part it could be explained by the union of fluoride to calcium carbonate, in the toothpaste that contains it. It can be concluded that at least for NaF paste the homogenization process is not complete, which could determine exposure to changing fluoride concentrations throughout the use of the tube.



## Referencias

---

- i Rugg-Gunn A, Bánóczy J. **Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses for home use**. Acta Med Acad. 42(2):168-78. **2013**
- ii Stephen KW. **Fluoride toothpastes, rinses, and tablets**. Adv Dent Res. 8:185-189. **1994**
- iii Rigalli A, Ricci D, Puche RC. **Instability of sodium monofluorophosphate in effervescent tablets**. Fluoride 39 (1) 19-22. **2006**
- iv Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun LR. **Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas**. 1° Ed. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina. ISBN 978-950- 673-616. **2007**
  
- v R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. **2015**

# ESTUDIO DE LA IMPORTANCIA CLÍNICA DE ErbB-2 EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

María Alicia Cortés<sup>1</sup>, Rosalía Cordo Russo<sup>2</sup>, Jorge Raúl Zimerman<sup>3,4</sup>

1-CONICET-Facultad de Medicina (UNNE). 2-Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). 3-Departamento de Oncología Hospital R.J. Vidal. 4-Facultad de Medicina (UNNE)

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) tiene una incidencia del 2,35% en el mundo y el 3,53% en Argentina, de los tumores del adulto. La predicción al 2020 considerando el cambio demográfico será: en la población mundial de 75.069 nuevos casos y en la Argentina de 596 (1). El CCR se caracteriza por ser altamente vascularizado y aproximadamente al 40% de los pacientes a los que se les practica la resección quirúrgica, desarrollan metástasis (2). Otra característica muy importante del CCR es que no responde a la radioterapia y quimioterapia convencional, hoy en día se están utilizando inhibidores de tirosina quinasas (TK) luego de la nefrectomía radical en los estadios avanzados, como son: Sorafenib, Sunitinib y Pazopanib con efecto anti-angiogénico, aunque este último tiene también efecto anti-proliferativo (3). Estudios recientes demuestran que el Sorafenib y Sunitinib, no aumentan la sobrevida de los pacientes con CCR avanzado (4). A su vez demostraron que el sunitinib solo o post nefrectomía tienen el mismo efecto (5). Sin embargo, con el Pazopanib se observa un aumento de sobrevida (6). Estos datos sugieren que, los mecanismos involucrados en la proliferación, podrían ser responsables de la tumorigénesis ya sea de manera independiente o coordinada con los mecanismos angiogénicos. El CCR tiene activo en la mayoría de los casos, el factor inducible por hipoxia (HIF) y los genes que este factor de transcripción activa. Entre ellos se encuentran el EGF y sus receptores, de los cuales parece claramente implicado el EGFR (7). Se conoce bien el poder oncogénico de ErbB-2 en membrana (MErbB-2), sin embargo en los CCR no se documentó MErbB-2. Nosotros hemos encontrado la expresión de MErbB-2 en nuestra población del 40% específicamente en el subtipo de CCR células claras, datos presentados en el congreso de SAIC 2015. Otro mecanismo de acción de ErbB-2 es el núcleo celular (NErbB-2) que induce la proliferación y la metástasis en el cáncer de mama (8-10). Postulamos que NErbB-2 en el CCR estaría relacionado con el avance del tumor. En lo relativo a la angiogénesis y proliferación resultados previos demostraron que, ErbB-2 no está relacionado con HIF-1 alfa. Por ello nos planteamos estudiar la co-expresión de ErbB-2 y HIF-2 alfa. Esto nos ayudaría a conocer si ErbB-2 estaría implicado en mecanismos moleculares relacionados con la angiogénesis y/o proliferación. A su vez, la relación de NErbB-2 con los parámetros clínicos de grado nuclear de furhman, estadio y supervivencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Pacientes:** Se seleccionaron 77 casos de CCR del Hospital R.J. Vidal, se analizaron los datos clínicos del Servicio de Oncología y la muestra de nefrectomía de cada uno de ellos con material incluido en parafina del Servicio de Anatomía Patológica, cumpliendo con los principios de la declaración de Helsinki.

**Muestras incluidas en parafina:** Los criterios de inclusión fueron: 1- muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer renal, 2- muestras estudiadas en el servicio de Anatomía Patológica y 3- muestras con igual o mayor a 50% de tejido tumoral. Los criterios de exclusión fueron: 1- muestras con necrosis, 2- fibrosis y/o hemorragia igual o mayor a 50%. Se realizaron cortes de 2 micras y se siguió el procedimiento de rutina para su coloración con Hematoxilina y Eosina.

**Inmunohistoquímica (IHQ):** En cortes de 2 micras, luego de desparafinar e hidratar, se realizó la exposición antigénica con Proteinasa K pH8 (10ug/ml). Se bloqueó: la peroxidasa endógena con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol y el tejido con albúmina bovina al 2%. Se incubó con anti-ErbB-2 3B5 (C15) (Pierce) monoclonal y anti-ErbB-2(C18) (Santa Cruz) policlonal, anti-HIF-1 $\alpha$  y EPAS1 (Novus) durante toda la noche. Se incubó con anti-mouse / anti-rabbit y Streptavidina (Kit ABC elite). Se reveló con DAB (Vector) y se contratiñó con Hematoxilina. Se analizó en el microscopio óptico con dos observadores independientes y las fotos se obtuvieron en una magnificación de 400X.

**Inmunohistofluorescencia (IHF):** Se realizó el protocolo según (8), se utilizaron cortes de 2 micras. Se incubó con anti-ErbB-2(C18) (Santa Cruz) durante toda la noche. Se incubó con anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (molecular probes-Thermo Fisher) y los núcleos se tiñeron con DAPI. Se analizó en el microscopio confocal Nikon Eclipse E800 con dos observadores independientes y las fotos se obtuvieron en una magnificación de 400X.

## RESULTADOS

### **ErbB-2 se localiza a nivel nuclear en el CCR claras:**

Las muestras reclutadas se muestran en la tabla 1, fueron en su mayoría del subtipo histológico de células claras, y mucho menos del subtipo papilar. Se han eliminado del estudio dos muestras que por falta de marcadores histológicos no se pudo definir si eran del subtipo cromóforo. Las muestras del tumor benigno, oncocitoma fueron utilizadas para contrastar los marcadores específicos del tumor.

Variante Histológica de CCR	Nº Casos
Células Claras	71
Oncocitoma (benigno)	4
Papilar	2

Tabla 1: Muestras reclutadas y variante histológicas de CCR

En primer lugar, para analizar ErbB-2 nuclear por inmunohistoquímica, hemos realizado el score que nos va a permitir cuantificar la presencia del oncogen. El **Score para ErbB-2 nuclear** fue adaptado de Cordo Russo, R. I. (2015). Según la intensidad y cantidad de células marcadas consideramos que:

0 NERbB2: nada o menos del 10% débil

1+ NERbB2: entre 10-25% débil

2+ NERbB2: entre 10-25% moderada

3+ NERbB2: más del 25% intensa

Fue validado por IHF considerando los mismos parámetros, se observa el score en la figura 1.

En segundo lugar, hemos hecho el análisis de ErbB-2 nuclear en el tipo histológico de células claras en donde hemos observado la expresión de ErbB-2 en membrana. Y de 60 casos estudiados, 33 presentan ErbB-2 en el núcleo, considerando positivos los 1+ (24), 2+ (7) y 3+ (2). Se muestra en la tabla 2, un resumen de los casos.

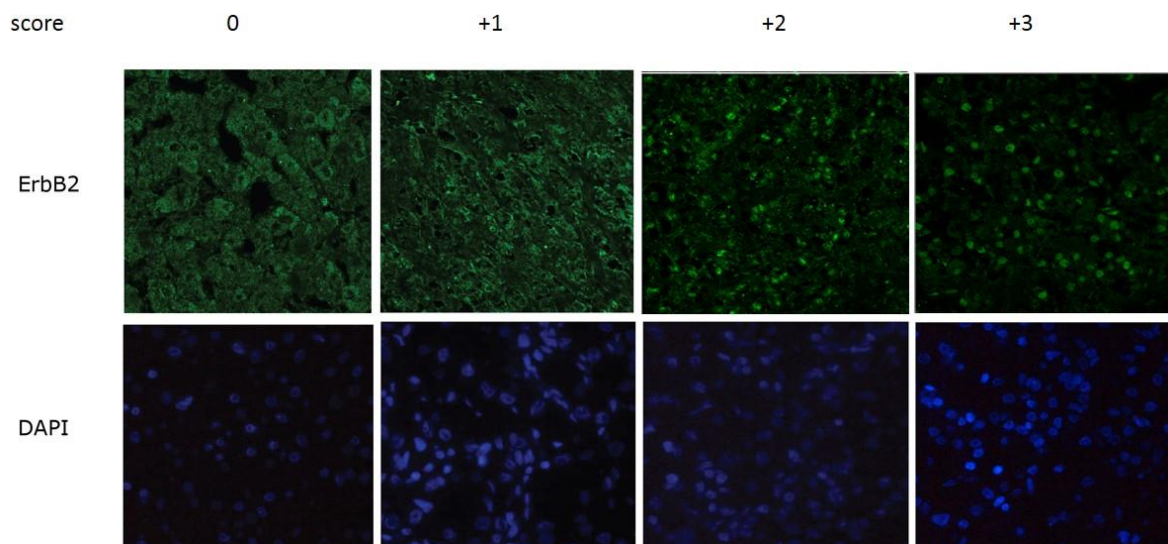


Figura 1: Score de NERbB-2 por IHF.

Score NerbB-2	Nº Casos
0	27
1+	24
2+	7
3+	2

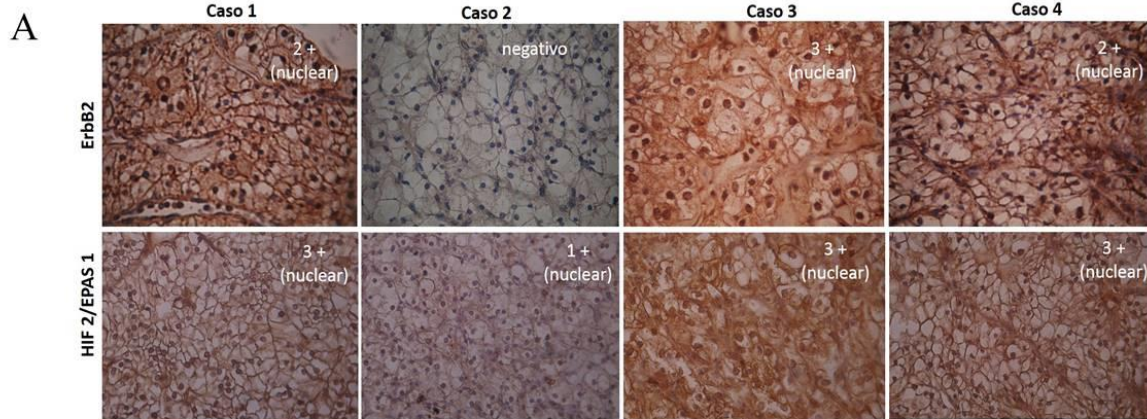
*Tabla 2: Análisis de NerbB-2 por IHQ. Total de casos 60*

**NerbB-2 se relaciona con EPAS1/HIF-2 en el CCR de células claras:**

Como hemos dicho en la introducción, previamente en nuestro laboratorio, demostramos que ErbB-2 no estaba relacionado con la isoforma 1 de HIF (HIF-1). Por lo que decidimos estudiar la relación de NerbB-2 y la isoforma 2 de HIF (EPAS1/HIF-2). Encontramos que, existe una tendencia de que EPAS1 se relacione con la expresión de ErbB-2, en el subtipo células claras. Observamos en la figura 2A que, EPAS1 se expresa en los casos que también se expresa ErbB-2 y sobre todo observamos ErbB-2 en el núcleo. Y en donde ErbB-2 es negativo tanto en la membrana como en el núcleo, no se observa expresión de EPAS1. El score utilizado para EPAS1, se consideró el mismo criterio que para ErbB-2 nuclear. Con los mismo parámetros de intensidad de color.

Estos datos son contrastables con la relación que existe entre ErbB-2 y EPAS1 en la expresión de mRNA. Hemos analizado en la base de datos del Oncomine, utilizando una base de 72 pacientes (TGCA renal y subtipo células claras), analizando la sonda 3 y 4 de ErbB-2 versus todas las sondas de EPAS1. Observamos en la figura 2B, con dos sondas representativas (sonda 3 para ErbB2 y sonda 1 para EPAS1) que existe correlación positiva, con R Pearson mayor a 0 y menor a 1. Podemos ver en los datos que arroja la tabla de contingencia (figura 2B-derecha) que 59 de 72 casos, expresan los dos genes, expresando una correlación positiva entre ambos genes. Sin embargo, 5 expresan solo EPAS1 y 7 expresan solo ErbB2, por lo que no es una correlación perfecta. A la Izquierda, se muestra el gráfico de dispersión de la expresión de EPAS 1 vs ErbB2. A la derecha, se muestra la Tabla de contingencia y Análisis estadístico de la expresión de EPAS 1 vs ErbB2, total casos 72.

E



B

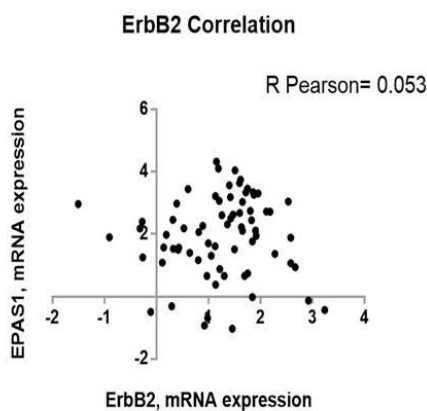


Tabla de contingencia sonda 3 ErbB2 \* sonda 1 EPAS1

Recuento

		sonda 1 EPAS1		Total
		0	1	
sonda 3	0	1	5	6
ErbB2	1	7	59	66
Total		8	64	72

Medidas simétricas

		Valor	Error tip. asint <sup>a</sup>	T aproximada <sup>b</sup>	Sig. aproximada
Intevalo por intervalo	R de Pearson	,053	,138	,447	,657 <sup>c</sup>
Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	,053	,138	,447	,657 <sup>c</sup>
N de casos válidos		72			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

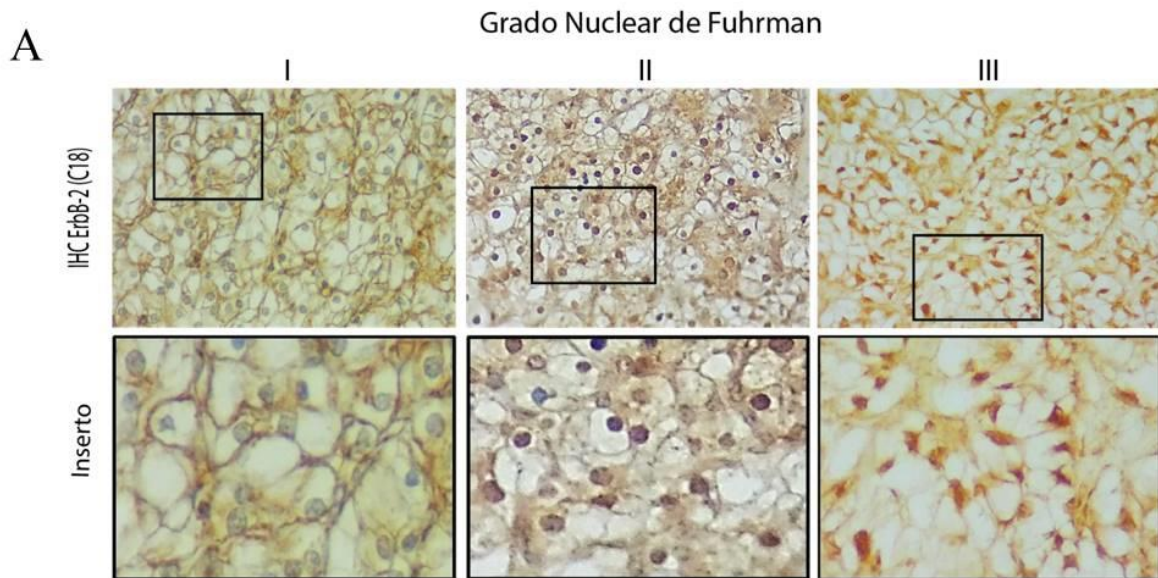
c. Basada en la aproximación normal.

Figura 2: ErbB-2 y EPAS1/HIF-2. A) Se muestran cuatro casos representativos de la IHQ de ErbB-2 y EPAS1. Amplificación 400X. B) Análisis de base de datos Oncomine de TGCA renal células claras.

### NerbB-2 se relaciona con el GNF y el Estadio Clínico en el CCR de células claras:

Histológicamente uno de los parámetros informados por anatomía patológica es el grado nuclear de Fuhrman (GNF), que mide la des-diferenciación nuclear y es indicador de mal pronóstico. Hemos realizado la validación de ErbB-2 nuclear en relación al GNF en 57 casos, y observamos que la localización de ErbB-2 aumentó significativa con el GNF II y III. Como vemos en la figura 3, a mayor GNF aumenta la posibilidad de encontrar a ErbB2 en el núcleo celular. En la gráfica A, se muestran tres casos representativos con su amplificación y en la gráfica B, la tabla de contingencia donde el estadístico CHI cuadrado, entre GNF I y II+III, dio un \*\*\*P=0.0007. Los casos con GNF IV son más escasos y quedaron fuera de este análisis, sin embargo es interesante destacar que observamos presencia de ErbB-2 nuclear en estos casos.





**B**

Datos Analizados	GNF I	GNF II + III	Total
NErbB2 (-)	6	15	21
NErbB2 (+)	1	34	35
<b>Total</b>	7	49	56

Figura 3: NErbB-2 y Grado Nuclear de Fuhrman. A) IHQ de ErbB-2 en tres GNF diferentes, Amplificación de 400X con inserto en 1000X. B) Resumen del análisis de IHQ de NErbB-2 agrupados en GNF I, II y III.

Con respecto al Estadio Clínico, la tendencia de encontrar ErbB-2 en el núcleo aumenta a estadios más altos. Se observa en la tabla (figura 4 arriba) que, en los estadios I y II (bajos) los pacientes presentan un 50% de encontrar NErbB-2. Sin embargo, en estadios III y IV (altos) el porcentaje aumenta en un 70% y 87% de presencia de NErbB-2. Lo que implica que NErbB-2 se correlaciona con el Estadio Clínico.

Con respecto a la Supervivencia de los pacientes, no hay relación de la presencia de NErbB-2 lo que significa que si está presente o no la supervivencia del paciente no se ve afectada. Se observa en la figura 4 abajo, que tras el análisis de Kaplan Meier, las curvas tienen la misma tendencia, azul para los NErbB-2 negativos y verde para los NErbB-2 positivos, representados en la gráfica como 0 y 1 respectivamente.

Estadio Clínico	NErbB-2 (+)	NErbB-2 (-)	total
I	11	11	22
II	5	4	9
III	14	6	20
IV	7	1	8
Total	37	22	59

### Funciones de supervivencia

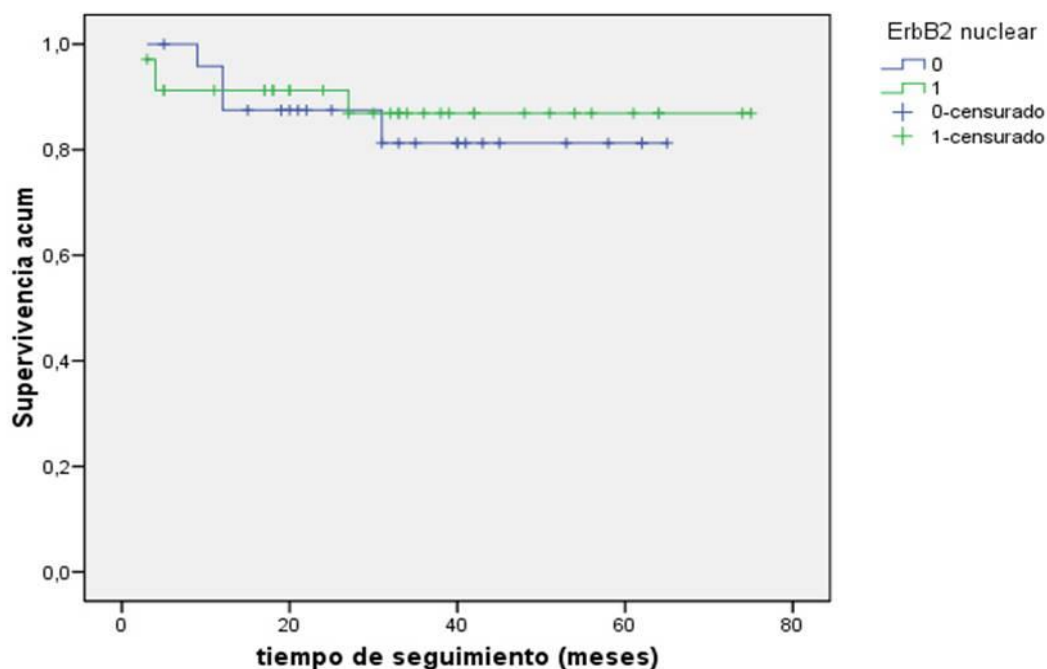


Figura 4: Relación de NErbB-2 con el estadio clínico (A) y la supervivencia (B)

## DISCUSIÓN

La presencia del oncogén ErbB-2 no está claramente documentada en el Cáncer de células renales, algunos autores analizan su amplificación del mRNA por PCR y no encuentran sobre- expresión de ErbB-2 en el CCR (11). Nosotros observamos que la proteína ErbB-2 se expresa en el CCR y que no solo se localiza en la membrana celular sino que también en el núcleo (NErbB-2) analizando las muestras por Inmunohistoquímica (IHQ). NErbB-2 está presente en el 50% de las muestras estudiadas, sin embargo la mayoría con un score de 1+ (bajo). Nuestra hipótesis es que, el anticuerpo utilizado (anti ErbB-2 3B5 Pierce) no tiene la misma fuerza para marcar NErbB-2 como el anti ErbB-2 C-18 Santa Cruz (8). Frente a esta problemática, deberíamos realizar las IHQ con el segundo anticuerpo para



analizar si el score aumenta, por ello hemos considerado los NerbB-2 de score 1+ en nuestro análisis.

Nosotros encontramos, que NerbB-2 se relaciona con la isoforma 2 de HIF y no con la isoforma 1. Existen datos que relacionan la presencia de ErbB-2 y HIF-2 en cáncer de mama, sin embargo estos son con ErbB-2 en membrana. Fuady, J and col, encontraron que HIF-2 está regulado por estrógenos en los cáncer de mama ErbB-2/ER positivos (12). Seguidamente y tras analizar los datos clínicos asociados a las muestras, hemos encontrado que, NerbB-2 se relaciona con el grado nuclear de fuhrman alto y el estadio clínico alto. Y tras el análisis de Kaplan Meier no hay relación con la supervivencia de los pacientes. Por lo que NerbB-2 estaría relacionado con la progresión tumoral, aunque no se modifique la supervivencia. En este punto nosotros hipotetizamos que, la falta de datos de seguimiento de algunos pacientes hace que no podamos clasificarlo correctamente al no conocer el estado del paciente, en el Kaplan Meier lo clasificamos como Vivo, por lo que en este aspecto podría cambiar el análisis. Debido que, cuanto mayor es el estadio clínico, menor es la supervivencia de los pacientes, nosotros hipotetizamos que NerbB-2 estaría asociado a un mal pronóstico en el CCR de células claras.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. IARC. Globocan Statics and Predictions 2012. Available from: [HTTP://GLOBOCAN.IARC.FR/PAGES/BURDEN\\_SEL.ASPX](http://GLOBOCAN.IARC.FR/PAGES/BURDEN_SEL.ASPX).
2. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, El-Naggar AK, Swanson DA, Fidler IJ, Dinney CPN. Expression Levels of Genes that Regulate Metastasis and Angiogenesis Correlate with Advanced Pathological Stage of Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2001;158(2):735-43.
3. Pick AM, Nystrom KK. Pazopanib for the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clinical Therapeutics*. 2012;34(3):511-20.
4. Haas NB, Manola J, Uzzo RG, Flaherty KT, Wood CG, Kane C, Jewett M, Dutcher JP, Atkins MB, Pins M, Wilding G, Cella D, Wagner L, Matin S, Kuzel TM, Sexton WJ, Wong Y-N, Choueiri TK, Pili R, Puzanov I, Kohli M, Stadler W, Carducci M, Coomes R, DiPaola RS. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10032):2008-16.
5. Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval J-B, Bensalah K, Geoffrois L, Thiery-Vuillemin A, Cormier L, Lang H, Guy L, Gravis G, Rolland F, Linassier C, Lechevallier E, Beisland C, Aitchison M, Oudard S, Patard J-J, Theodore C, Chevreau C, Laguerre B, Hubert J, Gross-Goupil M, Bernhard J-C, Albiges L, Timsit M-O, Lebre T, Escudier B. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(5):417-27.
6. Beaumont JL, Salsman JM, Diaz J, Deen K, McCann L, Powles T, Hackshaw MD, Motzer RJ, Cella D. Quality-adjusted Time Without Symptoms or Toxicity (Q-TWiST) Analysis of Pazopanib Versus Sunitinib in Patients With Renal Cell Carcinoma. *Cancer*. 2016;122(7):1108-15.

7. Zeng F, Singh AB, Harris RC. The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology. *Exp Cell Res.* 2009;315(4):602-10.
8. Schillaci R, Guzmán P, Cayrol F, Beguelin W, Díaz Flaqué MC, Proietti CJ, Pineda V, Palazzi J, Frahm I, Charreau EH, Maronna E, Roa JC, Elizalde PV. Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer. *BMC Cancer.* 2012;12:74-.
9. Cordo Russo RI, Béguelin W, Díaz Flaqué MC, Proietti CJ, Venturutti L, Galigniana N, Tkach M, Guzmán P, Roa JC, O'Brien NA, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV. Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance. *Oncogene.* 2014;34:3413.
10. Venturutti L, Romero LV, Urtreger AJ, Chervo MF, Cordo Russo RI, Mercogliano MF, Inurriagarro G, Pereyra MG, Proietti CJ, Izzo F, Díaz Flaqué MC, Sundblad V, Roa JC, Guzmán P, Bal de Kier Joffé ED, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV. Stat3 regulates ErbB-2 expression and co-opts ErbB-2 nuclear function to induce miR-21 expression, PDCD4 downregulation and breast cancer metastasis. *Oncogene.* 2015;35:2208.
11. Wang H, Liu C, Han J, Zhen L, Zhang T, He X, Xu E, Li M. HER2 expression in renal cell carcinoma is rare and negatively correlated with that in normal renal tissue. *Oncology letters.* 2012;4(2):194-8.
12. Fuady JH, Gutsche K, Santambrogio S, Varga Z, Hoogewijs D, Wenger RH. Estrogen-dependent downregulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-2 $\alpha$  in invasive breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(21):31153-65.

## **ABSTRACT**

The renal cell carcinoma (RCC) is refractory to chemotherapy and radiotherapy. When it is in advanced stages, decreased survival, and not always respond to kinase inhibitor therapy. In this context, we explored the expression of ErbB-2 nuclear and its relationship with the advance clear cell RCC. The techniques used were immunohistochemistry (IHQ) and Immunocytofluorescence confocal microscopy. We selected 77 paraffin- embedded tissue samples from a cohort of archived CCR from the files of the Histopathology of Vidal Hospital, Corrientes. Our results show that, the expression to ErbB-2 nuclear (NErbB-2) is of 50% (33/60) only Clear cell RCC, are not expression NErbB-2 in Oncocytoma and Papilar RCC. Here, we explored HIF-2/EPAS1 expression because we found in the correlation analysis EPAS1 and ErbB2 mRNA expression (TCGA Renal datasets in Oncomine Research Edition). Our results show relationship between EPAS1 and NErbB-2 by IHQ. We show that ErbB2 nuclear (NErbB-2) is correlated with histologic grade (Fuhrman Nuclear Grade, FNG) (Chi-square test \*\*\*P=0.0007 FNG 1 vs 2 y 3). Also, we show relationship between NErbB-2 and to the clinical stage. However, it is not related to the survival by Kaplan Meier analysis. Our findings showed ErbB-2 nuclear is implicated in the carcinogenesis to clear cell renal cell carcinoma. ErbB-2 nuclear it is associated with poor prognosis. Our challenge is elucidate the molecular mechanisms of partner ErbB-2/EPAS1 in renal cell carcinoma.

# GENES IMPLICADOS EN CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

Lic. Marisol Delea, Lic. Noemí Buzzalino, Dr. Pablo Barbero y Dra. María Paz Bidondo

Centro Nacional de Genética Médica - ANLIS

## INTRODUCCIÓN

La etiología de las CC es mayoritariamente heterogénea: entre el 50 y el 70% de los casos no existe una causa identificable para el defecto cardíaco y por lo general se los considera de etiología multifactorial, en donde intervienen factores genéticos y ambientales [1,2]. Entre las causas no genéticas se encuentran los teratógenos ambientales, exposición materna a alcohol, talidomida, medicamentos anticonvulsivantes, agentes infecciosos, etc.[3].

Entre los factores genéticos, las anomalías cromosómicas se detectan entre el 9% y el 18% de los pacientes[4]. Las alteraciones cromosómicas implican generalmente, enfermedades multiorgánicas en las que la cardiopatía es sólo parte de la afección general, como por ejemplo las trisomía 21, 18, 13 o la monosomía del X o bien otras anomalías cromosómicas estructurales menos frecuentes, tales como la delección 5p o la delección 4p [2,5].

Algunos pacientes, por su parte, poseen microdeleciones o microduplicaciones, comúnmente denominadas CNVs (*Copy Number Variations*), como causa de su afección. Diferentes estudios estiman una prevalencia de CNVs que oscila entre el 5 y el 30% de los afectados con CC[6,7]. Un ejemplo lo constituye la presencia de la microdelección en 22q11 que se observa en un 13 al 18 % de pacientes con cardiopatía conotruncal [8–11]. Las CNVs son más frecuentes en aquellos pacientes que poseen alguna otra malformación extracardíaca[12].

En alrededor del 5 al 20% de los pacientes, la aparición de la CC sería el producto de la alteración en un único gen, entre las que se incluyen la aparición de variantes patogénicas *de novo*[13–16]. Muchas de estas variantes se asocian a síndromes monogénicos como el de Marfan, Smith-Lemli-Opitz, entre otros. Sin embargo, mutaciones puntuales en determinados genes pueden conducir también a la aparición de CC aisladas, donde únicamente está afectado el corazón. Generalmente, corresponden a genes involucrados en la regulación de la transcripción, en las vías de transducción de señales, en la regulación de marcas epigenéticas o bien con proteínas estructurales cardíacas. Algunos ejemplos son los genes *NKX2-5*, *NKX2-6*, *GATA4*, *GATA5*, entre otros[1,17–22]. Es interesante destacar que una misma variante patogénica puede originar diferentes malformaciones cardíacas [20]. Toda esta variabilidad puede explicarse por factores genéticos, epigenéticos y ambientales.

El gen *NKX2-5* es el primer factor de transcripción para el cual se observó una asociación entre variantes génicas y CC, en particular con CIA[17,23]. Hoy por hoy, es uno de los genes más estudiados y en los que se han encontrado más cantidad de variantes de secuencia en relación a estas patologías[24].

*NKX2-5* pertenece a la familia génica NK que comprende un grupo específico de genes asociados a la diferenciación celular y regulación del tejido mesodérmico, mapea en 5q34, posee 2 exones y codifica para una proteína de 324 aminoácidos[25]. Se expresa en forma abundante en tejido cardíaco desde el período fetal y juega un rol significativo

en el desarrollo del nodo auriculoventricular, así como en el mantenimiento de su función a lo largo de la vida adulta[25,26].

Si bien los estudios de las causas genéticas de las CC en otras poblaciones comenzaron hace unos 10 años, en nuestro país, estos estudios son más recientes. Ente el 2013 y el 2014, nuestro grupo de trabajo realizó un trabajo multicéntrico con distintas regiones del país para relevar la presencia de anomalías cromosómicas y desbalance genómicos en pacientes con CCC[27]. Se analizaron 80 pacientes y si bien no se hallaron anomalías cromosómicas, el 39% de los afectados poseía alguna microduplicación o microdelección. Entre ellas, se halló la delección 22q11 en 16 pacientes. En el resto de los pacientes analizados es necesario identificar las causas genéticas de la afección si las hubiera.

El objetivo de este trabajo fue analizar variantes de secuencias en el NKX2.5 como posible causa de la aparición de la patología.

## MÉTODOS

**Muestra:** Durante el periodo de mayo 2013 a mayo 2014, se colectaron muestras provenientes de 4 hospitales de diferentes regiones de nuestro país: Resistencia (Chaco), La Plata (Pcia. de Buenos Aires), Neuquén y Salta. Se incluyeron muestras de sangre de 80 pacientes de hasta 16 años de edad con cardiopatías congénitas conotruncales (CCC) aisladas o asociadas a una o más anomalías congénitas mayores y no compatibles con un diagnóstico sindrómico. Todos los pacientes fueron evaluados por un médico genetista y un cardiólogo. En todos los casos la familia consintió en la realización de los estudios y firmó un Consentimiento Informado.

Para todas las muestras se realizó una extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica. En este trabajo, se incluyeron todas aquellas muestras en las que no se hayan detectado la presencia de microduplicaciones y/o microdelecciones genómicas que expliquen la patología(n=64)

### Búsqueda de variantes en el gen *NKX2-5*:

Los diferentes exones del gen y sus secuencias intrónicas lindantes fueron amplificados mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), los cebadores específicos se presentan en la tabla 1. Una vez determinadas las condiciones óptimas de amplificación, los productos de PCR se purificaron utilizando columnas. Los productos purificados se enviaron al servicio de secuenciación.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos del gen *NKX2-5*

Nombre	Tamaño del fragmento (pb)	Cebador directo (5'→3')	Cebador reverso (5'→3')
NKX2-5 I	638	aaactgctcatcgctcctgt	ctgagtttcttggggacgaa
NKX2-5 II	381	gaaagtggagtctgggatcg	gcctctgctcctcaacaac
NKX2-5 III.1	725	ccagacatcacctggtttt	cgagtcacctaggcatgg
NKX2-5 III.2	751	gtgctgaaactcacgtccac	gagctcagtcctcagttccaa

Una vez obtenidas las secuencias se analizaron mediante el programa MutationSurveyor. Se compararon las frecuencias obtenidas para las variantes en este cohorte con las publicadas en la base de datos genomAD <https://gnomad.broadinstitute.org/>.

La posible patogenicidad de las variantes se analizó *in silico* con los programas SIFT <http://sift.jcvi.org>, Polyphen <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>, DANN [https://cbcl.ics.uci.edu/public\\_data/DANN/](https://cbcl.ics.uci.edu/public_data/DANN/). GERP <http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/>, DEOGEN2 <https://deogen2.mutaframe.com/>, EIGEN <http://www.columbia.edu/~ii2135/eigen.html>, FATHMM-MKL <http://fathmm.biocompute.org.uk/fathmmMKL.htm>, MVP <https://github.com/ShenLab/missense>, MutationTaster <http://www.mutationtaster.org/>, REVEL <https://labworm.com/tool/revel>.

## RESULTADOS

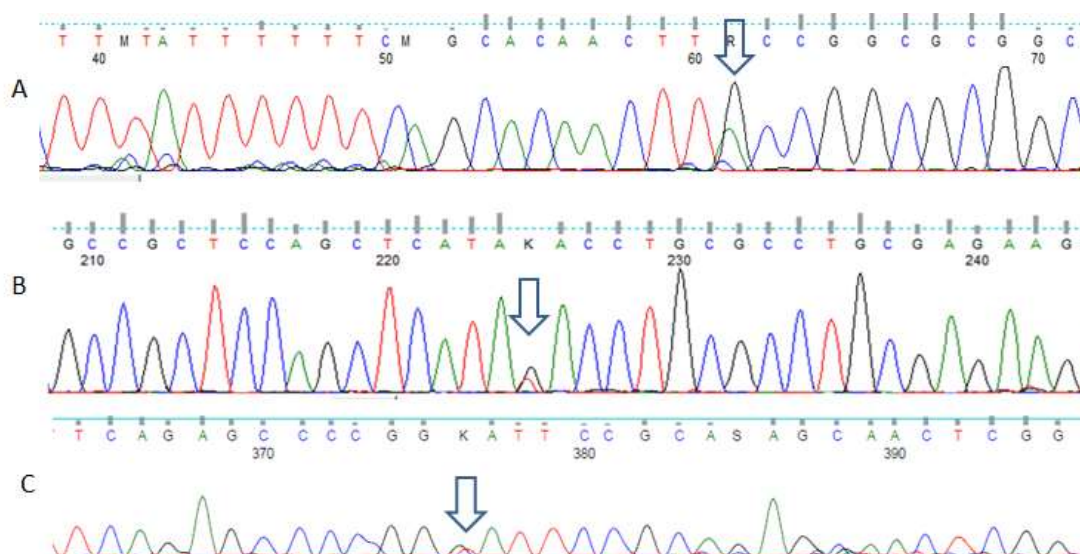
Para los 64 pacientes estudiados, las variantes halladas en el gen el gen NKX2-5 se resumen en la tabla 2. Se halló 1 variante en el 5' no codificante, 4 variantes en exones que representan un cambio sinónimo en la proteína, 5 variantes intrónicas sin cambios predichos en el splicing, y una variante en el 3' no codificante. De las 11 variantes halladas 3 son noveles (1 intrónica y exónicas) figura 1.

Tabla 2: Variantes halladas en el gen NKX2-5

HGVS	Localización	Análisis con predictores	ACMG	Clinvar	Cigocidad	Nº de alelos en la cohorte	Frecuencia en la cohorte	Frecuencia Total gnomAD	Frecuencia latina gnomAD
NM_004387.4: c.-104G>C	5'UTR	1 benigno, 0 patogenicos	VSI	-	HT	2	0.015625	0.0000325	0
NM_004387.4: c.63A>G	(p.Glu21=)	1 benigno, 0 patogenicos	B	B	HM/HT	68	0.53125	0.408	0.547
<b>NM_004387.4: c.334+618G&gt;A</b>	Intronica	8 benignos, 0 patogenicos	VSI	-	HT	1	0.0078125	0	0
NM_004387.4: c.335-723G>T	Intronica	1 benigno, 0 patogenicos	B	-	HT	2	0.015625	0.0142	0.0142
NM_004387.4: c.335-682G>C	Intronica	1 benigno, 0 patogenicos	B	-	HM/HT	28	0.21875	0.317	0.249
NM_004387.4: c.335-672G>A	Intronica	1 benigno, 0 patogenicos	PB	-	HT	2	0.015625	0.000318	0
NM_004387.4: c.335-88G>A	Intronica	1 benigno, 0 patogenicos	VSI	-	HT	1	0.0078125	0.0000202	0.000119
<b>NM_004387.4: c.450C&gt;A</b>	(p.Val150=)	1 patogenico , 0 benignos	VSI	-	HT	2	0.015625	-	-
NM_004387.4: c.543G>A	(p.Gln181=)	1 patogenico , 0 benignos	B	B	HT	4	0.03125	0.00748	0.00742
<b>NM_004387.4: c.921G&gt;T</b>	(p.Gly307=)	1 patogenico , 0 benignos	VSI	-	HT	1	0.0078125	-	-

HGVS: Human Genome Variation Society, VSI: Variante de significado incierto, UTR: untranslated region: region no traducida. HM: Homocigota, HT: heterocigota, PB posiblemente benigna, B: Benigna. = simboliza cambio sinonimo. ACMG: American College of Medical Genetics. En negrita variantes noveles.

**Figura 1** Electroforesis capilar de los fragmentos en los que se detectaron variantes noveles



Las flechas señalizan la variante detectada. **A:** fragmento directo con la variante NM\_004387.4:c.334+618G>A. **B:** fragmento reverso con la variante NM\_004387.4:c.450C>A. **C:** Fragmento directo con la variante NM\_004387.4:c.921G>T.

## CONCLUSIONES

Las cardiopatías congénitas (CC) constituyen las anomalías congénitas más frecuentes y una de las principales causas de mortalidad perinatal, siendo su prevalencia mundial alrededor de 1 de cada 125 nacimientos[28,29]. La mayor parte de los niños con CC no poseen otros defectos asociados, si bien en el 25 al 40% de los casos, la CC forma parte de un síndrome identificado[2].

En casi el 70% de los casos no existe una causa identificable para el defecto cardíaco y por lo general se los considera de etiología multifactorial, en donde intervienen factores de riesgos genéticos y ambientales. Sin embargo se ha reportado recurrencia familiar, tanto para casos sindrómicos como para los casos aislados[1]. Estas observaciones son consistentes con la contribución de factores genéticos en el desarrollo de la patología.

En este trabajo nos propusimos evaluar la presencia de variantes secuencia en el gen NKX2-5 en una muestra de afectados con CCC de nuestra población. En la muestra analizada no se hallaron variantes que se asocien a la afección en la muestra analizada. Las 11 variantes encontradas fueron predichas como benignas o de significado incierto incluyendo tres variantes noveles. Como pudimos observar la frecuencia de algunas variantes en esta cohorte no es similar a las reportadas en las bases de datos de consulta por lo que queremos resaltar la importancia de crear una base de datos de nuestra población que nos permita evaluar si las variantes halladas se encuentran o no en la nuestra población general.

Si bien está descrito que alrededor del 5-10% de los pacientes con CC presentan variantes puntuales como causa de su afección[22], la posibilidad de hallar variantes asociadas a patología es más probable si se toman casos con antecedentes familiares que casos esporádicos y casos sindrómicos que en comparación con aislados. Asimismo, la cantidad de genes asociados a la patología son muchos, por lo que se espera que haya un número muy reducido de pacientes que presenten mutaciones en un dado gen. Teniendo en cuenta estas consideraciones, es que hoy en día se prefiere realizar este tipo de estudio

mediante el análisis de varios genes en paralelo en lo que se conoce como secuenciación de nueva generación (NGS). Como parte de la continuidad de este estudio, se está encarando este tipo de abordaje para un número selecto de pacientes debido a los altos costos, por ahora, para este tipo de análisis.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Zaidi S, et al.. *Circ Res*. 2017;120: 923–940.
2. Richards AA, et al. *Pediatr Res*. 2008;64: 358–363.
3. Patel SS, et al. *Pediatr Cardiol*. 2013;34: 1535–1555.
4. Hartman RJ, et al. *Pediatr Cardiol*. 2011;32: 1147–1157.
5. Richards AA et al. *Curr Cardiol Rev*. 2010;6: 91–97.
6. Glessner JT, et al. *Circ Res*. 2014;115: 884–896.
7. Kim DS, et al. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;151: 1147–1151.e4.
8. Devriendt K, et al. *European journal of pediatrics*. 1996. p. 721.
9. Goldmuntz E et al. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32: 492–498.
10. Marino B et al.. *Genet Couns*. 1999;10: 25–33.
11. Derbent M et al. *Am J Med Genet A*. 2003;116A: 129–135.
12. Azamian M et al. 2016;7: 51–61.
13. Fahed AC et al. *Heart Fail Clin*. 2014;10: 219–227.
14. Homsy J et al. *Science*. 2015;350: 1262–1266.
15. Sifrim A et al. *Nat Genet*. 2016;48: 1060–1065.
16. Szot JO et al. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11: e001978.
17. Su W et al. *Clin Genet*. 2017;91: 349–354.
18. Bakker MK et al. *BMJ Open*. 2019;9: e028139.
19. Zaidi S, et al. *Nature*. 2013;498: 220–223.
20. Fahed AC et al. *Circ Res*. 2013;112: 707–720.
21. Blue GM et al. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64: 2498–2506.
22. Jia Y et al. *Am J Med Genet A*. 2015;167A: 1822–1829.
23. Schott JJ et al. *Science*. 1998;281: 108–111.
24. Muntean I et al. *Biochem Genet*. 2017;55: 105–123.
25. Shiojima I, et al. *Genomics*. 1995;27: 204–206.
26. Ellesøe SG, et al. *Congenit Heart Dis*. 2016;11: 283–290.
27. Delea M, et al. *Genes* . 2018;9. doi:10.3390/genes9090454
28. Landrum MJ, et al. 2016;44: D862–8.
29. MacDonald JR et al. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: D986–92.



## **ABSTRACT**

Congenital heart defects (CHD) etiology is mostly heterogeneous, about 50 to 70% of cases there is no identifiable cause for the heart defect and they are generally considered multifactorial etiology, where genetic and environmental factors are involved. Non-genetic causes include environmental teratogens, maternal exposure to alcohol, among others.

There are different genetic causes, chromosomal abnormalities are detected between 9% to 18% of patients. Some patients have microdeletions or microduplications, with a prevalence ranging from 5 to 30%. 22q11 microdeletion is the most frequent in patients with CHD. From 5 to 20% of patients, the appearance of CHD would be the product of the alteration in a single gene. The NKX2-5 gene is the first transcription factor for which an association between gene variants and CHD was observed. Although studies of the genetic causes of CHD began about 10 years ago in other populations, in our country, these studies are more recent. The objective of this work was to analyze sequence variants in NXX2.5 as a possible cause of the pathology. We found 11 variants predicted as benign or with uncertain significance including 3 novel variants. The frequency of some variants in this cohort did not match those reported in the consulted databases, showing the importance of making our database that will allow us to evaluate whether the variants are found or not in our general population.

# EVALUACIÓN DEL PERFIL MUTACIONAL Y SU RELACIÓN CON LOS FACTORES PRONÓSTICO EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Patricia Dos Santos

Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina

## Resumen

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la neoplasia a células B maduras más frecuente en adultos de Occidente. Un aspecto característico de esta entidad es la variabilidad en la evolución clínica de los pacientes, con casos que presentan larga sobrevida con poco requerimiento terapéutico y otros que muestran rápida progresión de la enfermedad a pesar de los tratamientos específicos. Los estudios citogenéticos y citomoleculares y el estado mutacional de *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*) constituyen robustos factores pronóstico que han permitido establecer importantes grupos de riesgo. Estudios relativamente recientes basados en secuenciación masiva paralela, han permitido detectar mutaciones en diferentes genes que impactan en distintas vías de señalización. Entre ellos encontramos: *NOTCH1* (*Notch homolog 1, translocation associated*), *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*), *SF3B1* (*splicing factor 3B subunit 1*) y *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat-containing protein 3*), de probable importancia para refinar la estratificación pronóstica de los pacientes con esta patología. En el presente estudio se efectuó el análisis de mutaciones en los genes previamente mencionados en 90 pacientes con LLC. En todos los casos se realizó extracción de ADN, PCR y posterior secuenciación. Los resultados se compararon con los factores pronóstico de la patología. No se encontraron mutaciones para *MYD88*, sugiriendo una muy baja frecuencia de mutaciones de este gen en nuestra población. El análisis de *NOTCH1* mostró la presencia de la mutación c.7541\_7542delCT en dos pacientes. El caso 1 presentó un cariotipo complejo: 46-47,XX,+12,+16,-20[cp7]/46,XX[8] en tanto que la evaluación por FISH (*fluorescence in situ hybridization*) detectó trisomía 12 en el 39,7% de las células analizadas. El segundo caso mostró un clon con delección 13q14 por FISH, correspondiente al 12,8% de las células evaluadas. Ambos pacientes presentaron *IGHV* no mutada (NM) con un 100% de homología con la línea germinal, observándose en el primero el rearrreglo IGHV5-51-01 y en el segundo IGHV3-11-01. Nuestros resultados muestran una frecuencia de mutaciones en *NOTCH1* menor que la reportada en la literatura, siendo importante ampliar el número de pacientes a fin de confirmar esta diferencia. Asimismo, nuestros hallazgos resultan concordantes con datos de la literatura que muestran asociación de las mutaciones de *NOTCH1* con la presencia de *IGHV* NM y de trisomía 12, identificando a un subgrupo de pacientes caracterizados biológicamente por disregulación del ciclo celular y corta sobrevida. El análisis de los genes *SF3B1* y *BIRC3* no mostró la presencia de mutaciones, pero si se observaron variantes en ambos genes. En *SF3B1* se encontraron cinco variantes, dos en el exón 14 y tres en el 15, tres de ellas con probable valor patogénico. Por su parte, en el gen *BIRC3* se detectaron tres variantes en los exones 7, 8 y 10, sin relevancia clínica. Uno de los casos presentó un cariotipo patológico con dos marcadores, y mostró evidencia de evolución clonal por FISH, en tanto que el restante presentó un cariotipo normal y delección 13q14 por FISH. El análisis de *IGHV* mostró rearrreglos que involucraron a la familia VH1, uno M y el otro NM. Los resultados obtenidos indican una muy baja

incidencia de mutaciones de *SF3B1* y *BIRC3* en nuestros pacientes con LLC o bien una frecuencia clonal por debajo del límite de resolución de la metodología empleada en el presente estudio, siendo necesario efectuar un abordaje utilizando las nuevas técnicas de secuenciación masiva paralela que presentan mayor sensibilidad. No obstante, resulta interesante el hallazgo de variantes probablemente patogénicas en el gen *SF3B1* con la información disponible al momento, las que deben ser revisadas periódicamente a fin de confirmar su patogenicidad. Sin duda la realización sistemática de estos estudios permitirá ahondar en la caracterización biológica de la LLC así como aportar al conocimiento de las causas de la amplia heterogeneidad clínica presente en la patología, integrando las nuevas mutaciones en un perfil de riesgo conjunto con los rearrreglos genómicos asociados a esta entidad.

## Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la neoplasia a células B maduras más frecuente en adultos de Occidente. Un aspecto característico de esta entidad es la variabilidad en la evolución clínica de los pacientes, con casos que presentan larga sobrevida con poco requerimiento terapéutico y otros que muestran rápida progresión de la enfermedad a pesar de los tratamientos específicos, no siendo suficientes los sistemas de estadificación y los parámetros biológicos disponibles para predecir este comportamiento diferente (Chiorazzi, 2015; Hallek, 2017). Entre los factores pronóstico disponibles encontramos el estado mutacional de *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*) (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 1999) y los estudios citogenéticos y citomoleculares (Haferlach et al, 2007; Travella et al, 2013; Döhner et al, 2000; Van Dyke et al, 2016), que han permitido establecer importantes grupos de riesgo. Estudios relativamente recientes basados en secuenciación masiva paralela, han permitido detectar mutaciones en diferentes genes que impactan en distintas vías de señalización. Entre ellos encontramos: *NOTCH1* (*Notch homolog 1, translocation associated*) (9q34.3), *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*) (3p22.2), *SF3B1* (*splicing factor 3B subunit 1*) (2q33.1) y *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat-containing protein 3*) (11q22.2), de probable importancia para refinar la estratificación pronóstica de los pacientes con esta patología.

El gen *NOTCH1* codifica para una proteína de transmembrana que actúa como un factor de transcripción cuya activación constitutiva ha sido relacionada con resistencia a la apoptosis y aumento de la sobrevida de las células leucémicas (Rossi et al, 2012a; Gianfelici et al, 2012). Las mutaciones ocurren preferentemente en el exón 34 (83% de los casos), y generan la aparición de codones *stop* prematuros que originan una proteína NOTCH1 constitutivamente activa y más estable, que carece del dominio PEST en el extremo C-terminal, responsable de la degradación proteasomal (Sportoletti et al, 2010; Fabbri et al, 2010; Puente et al, 2011). Por su parte, *SF3B1* es un componente del *core* del “*spliceosoma*”, un complejo involucrado en el *splicing* del presursor del ARNm y en la formación del ARN maduro (Whal et al, 2009). Las mutaciones de este gen en LLC afectan por lo general el dominio HEAT de la proteína, modificando su funcionamiento (Wang et al, 2011; Rossi et al, 2011), y afectando la interacción de *SF3B1* con el RNA (Quesada et al, 2011), siendo la mutación más frecuente K700E observada en aproximadamente el 50% de los casos. Estudios recientes sugieren que *SF3B1* podría controlar el ciclo celular y la apoptosis y que sus mutaciones llevarían a errores en el *splicing* de transcritos específicos que afectarían la patogénesis de la LLC así como

también podrían influir en la respuesta del daño al ADN (Te Raa et al, 2015). Un reciente meta-análisis encuentra una supervivencia libre de progresión y supervivencia global significativamente más cortas en los casos con *SF3B1* mutado respecto de los no mutados (Zhang et al, 2017). ***BIRC3*** es un regulador negativo de la quinasa serina treonina MAP3K14, importante activador de NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) (Zarnegar et al, 2008). Se encuentra involucrado en el mantenimiento de los niveles de *TP53* (*Tumor protein p53*), a través de la modulación de *MDM2* (*Mouse Double Minute 2, Human Homolog*), y su represión contribuye a la progresión neoplásica (Lau et al, 2012). *BIRC3* se encuentra ubicado a 6Mb centromérico al locus de *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), observándose la pérdida de un alelo de *BIRC3* en el 80% de los pacientes con delección de *ATM* (Rossi et al, 2012b; Rose-Zerilli et al, 2014). Las mutaciones de este gen en LLC determinan la ruptura del dominio RING en el extremo C-terminal de la proteína, cuya actividad es necesaria para permitir la degradación del proteasoma a través de MAP3K14, llevando a la activación constitutiva no-canónica de NF- $\kappa$ B, considerado como un mecanismo de resistencia a la erradicación de la leucemia (Rossi et al, 2012b). En cuanto al gen ***MYD88***, el mismo se encuentra involucrado en el camino de señalización de IL-1 y de receptores Toll-like (TLR) (Jeelall et al, 2011); tiene un rol importante en la respuesta inmune innata y en la homeostasis de las células B (Rowling et al, 2012). La mutación más frecuente se encuentra en el exón 5 y determina el cambio del aminoácido leucina por prolina en la posición 265 de la proteína (L265P) (Treon et al, 2012), llevando al aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B y del camino de señalización JAK (*Janus kinase*)-STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), con la consecuente producción de citoquinas y el incremento de la supervivencia celular (Ngo et al, 2011). La alta producción de estas citoquinas ha sido relacionada con el secuestro de macrófagos y linfocitos T por las células de LLC, creando un nicho favorable para su supervivencia (Burger et al, 2009).

Esta misma mutación ha sido detectada en diferentes linfomas, indicando su relevancia en la patogénesis de neoplasias linfoides (Ngo et al, 2011). En este marco, el presente estudio estuvo dirigido al análisis de mutaciones en los genes previamente mencionados tendiente a lograr una mayor comprensión de las características biológicas de la LLC.

## Materiales y métodos

### Pacientes estudiados

Durante el desarrollo de este estudio se analizaron un total de 90 muestras de ADN de pacientes con LLC, provenientes del Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina. La distribución por edad, sexo y estadios clínicos (Rai et al, 1975) se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1: Distribución por edad, sexo y estadios clínicos de los pacientes con LLC estudiados**

Nº de Casos	Edad Media (Rango; años)	Sexo		Estadio clínico (%)		
		F	M	0	I-II	III-IV
90	66,39 (36-89)	38	52	35,8	50,74	13,46

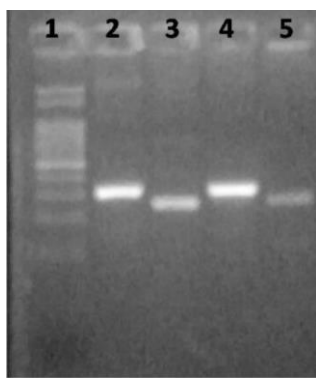
## Metodología

Se efectuó la puesta a punto de la detección de mutaciones en los genes *MYD88*, *NOTCH1*, *SF3B1* y *BIRC3*. Se detalla a continuación la metodología empleada para cada uno de los genes analizados.

- Extracción de ADN total: Se trabajó con muestras de sangre periférica (SP). Se efectuó de acuerdo al protocolo estándar: lisis celular (RCLB: 50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), digestión con Proteinasa K (100µg/ml y SDS 0,5%) y posterior extracción por el método de fenol-cloroformo. La concentración, pureza y calidad de las muestras se evaluarán utilizando un Nanodrop en la región del ultravioleta a 230, 260 y 280 nm.

### Gen *MYD88*:

Se efectuó el análisis de la mutación L265P mediante PCR alelo específica (ASO-PCR). Para ello se realizaron dos PCRs por paciente, usando tres diferentes primers. Un *primer Forward* común para ambas reacciones “MYD88-s” (sense) 5'-GCTGTTGTTAACCCT GGGGTTGAAG-3', y dos *primers Reverse* diferentes (antisense): “MYD88-as” (5'-GAACCTCAGGATGCTGGGGAAC-3') que origina un producto de 160 pb, y “MYD88-MUT-as” (5'-CTTGTACTTGATGGGGAACG-3') de unión específica al alelo mutado, generando un producto de 122 pb (Capaldi et al, 2014) (Figura 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25ul, empleando 100ng de ADN de pacientes y controles, 5X Buffer Green GoTaq, 5U/ul Taq Inbio Highway, 10mM dNTPs, 10uM de cada *primer* y agua libre de nucleasas. Las condiciones para el ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguido de 33 ciclos de 94°C 30 seg, 57°C 45 seg, y 72°C 1 min, con una extensión final de 72°C por 7 min, seguido de observación en un gel de agarosa al 2%.



**Figura 1:** Gel de agarosa para *MYD88*. Calles 2 y 4: bandas de 160pb (control interno). Calles 3 y 5: bandas de 122pb (mutación). La calle 1 contiene al marcador de peso molecular (100pb).

### Gen *NOTCH1*:

En este caso se efectuó la detección de la mutación c.7541\_7542delCT también mediante ASO-PCR. Se realizaron dos reacciones de PCR con tres primers diferentes, pero a diferencia de *MYD88* se efectuaron en un único tubo de PCR. Se utilizó un *primer*

*Reverse* común, Notch1\_Rv (5'- AAGGCTTGGGAAAGGAAGC-3'), y dos *primers Forward*: Notch1\_Fw C (5'-GTGACCGCAGCCCAGTT-3'), que sirve como control interno de la PCR y amplifica tanto para el alelo *wild type* como para el alelo mutado, con productos de 285 pb y 283 pb respectivamente, y Notch 1\_Fw Mut (5'-TCCTCACCCCGTCCCGA-3'), que amplifica un segmento de 183 pb solamente ante la existencia de la mutación (Lionetti et al, 2014). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25ul, empleando 50ng de ADN de pacientes y controles, 5X Buffer Green GoTaq, 5U/ul Taq Inbio Highway, 10mM dNTPs, 10uM de cada primer y agua libre de nucleasas. Las condiciones para el ciclado fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguido de 33 ciclos de 94°C 30 seg, 61°C 40 seg, y 72°C 1 min, con una extensión final de 72°C por 7 min, con observación en un gel de agarosa.

### Gen *SF3B1*:

Para la puesta a punto de la detección de mutaciones de este gen se amplificó un segmento de 1175pb, que abarca los exones 14 a 16, utilizando los *primers* 14 *Forward* y 16 *Reverse* (Oscier et al, 2013) (Tabla 2):

En este amplicón se encuentran los 10 puntos más frecuentes de mutaciones (cambios de aminoácidos), distribuidos en 4 puntos calientes, como se detalla:

Exón 14: Y623C/R625H/N626Y; H662D/T663I/K666E.

Exón 15: K700E/V701F.

Exón 16: K741N/G742D.

Posteriormente, se utilizó este fragmento como templado para los *primers* específicos de cada segmento (14, 15 y 16) (Oscier et al, 2013) (Tabla 2), obteniendo fragmentos de menor tamaño: 375pb, 209pb y 268pb, respectivamente, seguido de secuenciación directa de los productos de PCR.

#### **Tabla 2: Secuencias de los *primers* utilizados**

SF3B1\_Ex14\_F: CCAACTCATGACTGTCTTTCTT

SF3B1\_Ex14\_R: GGGCAACATAGTAAGACCCTGT

SF3B1\_Ex15\_F: TTGGGGCATAGTTAAACCTG

SF3B1\_Ex15\_R: AAATCAAAAGGTAATTGGTGGA

SF3B1\_Ex16\_F: TCTTCATTAAAGTTAAGGCGACA

SF3B1\_Ex16\_R: TGTTAGAACCATGAAACATATCCA

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25ul, empleando 75ng de ADN de pacientes y controles, 5X Buffer Green GoTaq, 5U/ul Taq Inbio Highway, 10mM dNTPs, 10uM de cada *primer* y agua libre de nucleasas. Las condiciones para el ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C 30 seg, 57°C 30 seg, y 72°C 1 min, con una extensión final de 72°C por 5 min, con posterior observación en un gel de agarosa.

### Gen *BIRC3*:

Se realizó la amplificación de 3 segmentos, que incluían a los exones 7, 8, 9 y 10, los dos últimos en un solo fragmento. Posteriormente se efectuó secuenciación directa de

los productos de PCR. Para la amplificación de los tres segmentos se utilizó la misma mezcla de reacción, empleándose los *primers* detallados en la Tabla 3. En todos los casos la reacción de PCR fue la siguiente: 100ng de ADN, Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTPs 0.2mM, *Primer Forward* 0.4μM y *Primer Reverse* 0.4μM, Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 2U/100 μl, y agua c.s.p 25μl finales.

**Tabla 3: Primers utilizados en la ampliación de BIRC3**

Secuencias	Referencia
BIRC3_SeqEx7F: TGCCTATACATTTTGTGGTT	Winkelmann et al, 2015
BIRC3_SeqEx7R: AAAAACCTGACTGGATTGAG	Winkelmann et al, 2015
BIRC3_EX8F: GCAATCAACATCAATGCCTTAC	Baliakas et al, 2015a
BIRC3_EX8R: CAGGCATGAGTCACCACATT	Baliakas et al, 2015a
BIRC3_EX9F: CTTCTGTTGCCTTGAAATGAG	Baliakas et al, 2015a
BIRC3_EX10R: AGTGCTACCTCTTTTTCGTTCA	Baliakas et al, 2015a

En cuanto al ciclado, para el exón 7 fue: desnaturalización inicial 94°C 4min, seguida por 40 ciclos de desnaturalización 94° 30seg, *annealing* 52°C 30seg, elongación 72°C 45seg, y una elongación final 72°C 5min. Para el exón 8 y el segmento correspondiente a los exones 9-10: desnaturalización inicial 94°C 4min, seguida por 38 ciclos de desnaturalización 94° 30seg, *annealing* 58°C 30seg, elongación 72°C 45seg, y una elongación final 72°C 5min.

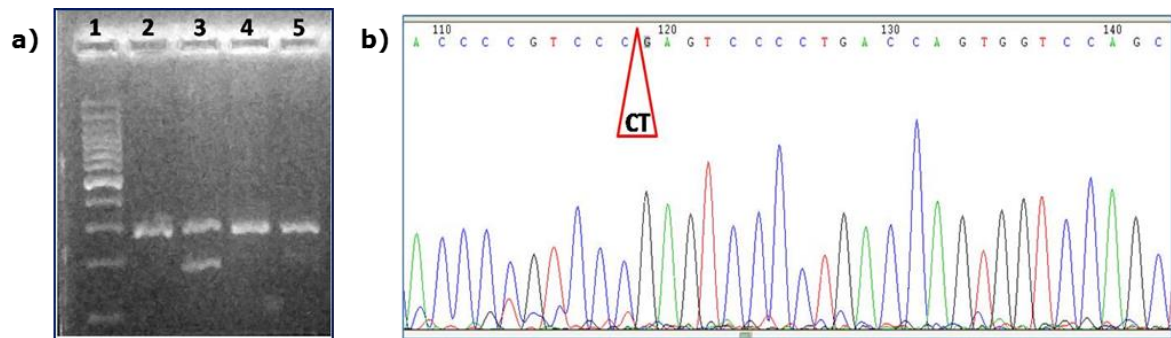
## Resultados y discusión

### Gen MYD88:

Para este gen se analizaron un total de 90 pacientes, no detectándose la mutación en ninguno de ellos. Esta situación sugiere una muy baja frecuencia de mutaciones de este gen en nuestra población. No obstante, resulta de interés destacar que constituye la única mutación asociada a buen pronóstico, siendo detectada en casos con delección 13q14 y con *IGHV* mutado (M), parámetros relacionados con buena evolución clínica en LLC. Recientemente, Baliakas et al (2015b) detectaron una tendencia en los pacientes con *MYD88* mutado al uso del rearreglo *IGHV3-23* no estereotipado.

### Gen NOTCH1:

En este caso, se analizaron 46 pacientes, detectándose la mutación c.7541\_7542delCT en dos casos (4,3%). En la Figura 2a se evidencia la presencia de la misma en la calle 3. El producto de uno de los casos fue secuenciado para obtener confirmación del hallazgo, y en la Figura 2b se observa el electroferograma donde se indica con un triángulo rojo el lugar donde se produjo la delección CT.



**Figura 2: a)** Gel de agarosa para *NOTCH1* del caso 1: calles 2, 4 y 5: bandas 285 pb (control interno *wild type*). Calle 3: banda de 283 pb (control interno mutado) y de 183pb (delección). La calle 1 contiene al marcador de peso molecular (100pb). **b)** Electroferograma donde se indica la delección CT correspondiente a la mutación buscada.

Simultáneamente, se efectuó el estudio citogenético, citomolecular y de *IGHV* de ambos pacientes. El caso 1 mostró un cariotipo complejo: 46-47,XX,+12,+16,-20[cp7]/46,XX[8] en tanto que la evaluación por FISH detectó trisomía 12 en el 39,7% de las células analizadas. El segundo caso no presentó células en división no pudiendo efectuarse el estudio citogenético, pero la evaluación por FISH mostró un clon con delección 13q14, correspondiente al 12,8% de las células evaluadas. Ambos pacientes presentaron *IGHV* no mutada (NM) con un 100% de homología con la línea germinal, observándose en el primero el rearrreglo *IGHV5-51-01* y en el segundo *IGHV3-11-01*.

Nuestros resultados muestran una frecuencia de mutaciones en *NOTCH1* menor que la reportada en la literatura tanto para pacientes europeos (11%) (Foá et al, 2013; Dal Bo et al, 2014) como asiáticos (8%) (Xia et al, 2015; Zou et al, 2018), siendo importante ampliar el número de pacientes a fin de confirmar esta diferencia. Asimismo, nuestros hallazgos resultan concordantes con datos de la literatura que muestran asociación de las mutaciones de *NOTCH1* con la presencia de *IGHV* NM y de trisomía 12 (Rossi et al, 2012a; Ballatti et al, 2012; Dal Bo et al, 2014), identificando a un subgrupo de pacientes caracterizados biológicamente por desregulación del ciclo celular y corta sobrevida. Las mutaciones de *NOTCH1* son consideradas predictoras de mala evolución clínica, encontrándose asociadas a transformación a síndrome de Richter (Rossi et al, 2012a).

#### Genes *SF3B1* y *BIRC3*:

Para ambos genes se analizaron 62 pacientes, de los cuales se obtuvieron las secuencias *Forward* y *Reverse*, completando un total de 372 secuencias analizadas. En estos casos no se detectaron mutaciones pero si se observaron variantes de *SF3B1* para los exones 14 y 15 en 4 casos que se describen a continuación (Tabla 4).



**Tabla 4: Variantes encontradas en los exones 14 y 15 del gen *SF3B1* en pacientes con LLC.**

Caso	Exón	Variante	Cambo alélico	Cambio de aa	Significado clínico
3	14	rs377023736	AAG ⇒ AAC	K [Lys] ⇒ N [Asn]	Probablemente patogénica
3	15	rs10193750	Variante intrónica C/T		Sin información
4	14	rs374250186	AAG ⇒ AGG	K [Lys] ⇒ R [Arg]	Probablemente patogénica
5	14	rs374250186	AAG ⇒ ATG	K [Lys] ⇒ M [Met]	Probablemente patogénica
5	15	rs776846119	GGA ⇒ GAA	G [Gly] ⇒ E [Glu]	Sin información
6	15	rs559063155	AAA ⇒ GAA	K [Lys] ⇒ E [Glu]	Probablemente patogénica

En la Tabla 5 se detallan edad, sexo, estadio clínico, cariotipo, FISH, *IGHV* y sobrevida libre de eventos (SLE) de cada uno de los pacientes:

**Tabla 5: Características clínicas, citogenéticas e *IGHV* de los pacientes con variantes del gen *SF3B1*.**

Caso	Edad/Sexo	Estadio clínico (Rai)	Cariotipo	FISH	<i>IGHV</i>	SLE (meses)
3	44/M	I	46,XY	NN	VH4-59-07 M: 87,9%	88
4	38/M	II	46,XY	13q14 (90%)	VH3-21-02 NM: 100%	1
5	73/F	IV	46,XX	+12:10% 13q14: 80,7%	VH4-34-01 M: 92,4%	-
6	69/M	I	46,XY	13q14: 53,4% 11q22: 9,4%	VH3-66-01 NM:98,5%	32

M: masculino; F: femenino; NN: Normal; M: mutado; NM: no mutado; SLE: sobrevida libre de eventos; 13q14: delección 13q14; +12: trisomía 12.

Es de destacar que tres de los cuatro pacientes con variantes de este gen presentaron del13q14, dos de ellos con porcentajes por encima del 70%, valor asociado a progresión de la enfermedad en nuestro medio (Palau Nagore et al, 2017). En cuanto al análisis de *IGHV*, dos de los casos fueron LLC-M con rearrreglos correspondientes a la familia VH4 y los otros dos presentaron *IGHV*-NM correspondientes a la familia VH3.

En lo que respecta a la evaluación de *BIRC3*, se encontraron variantes en tres pacientes, en los exones 7, 8 y 10, respectivamente, que se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6: Variantes encontradas en los exones 7, 8 y 10 del gen *BIRC3* en pacientes con LLC.**

Caso	Exón	Variante	Cambo alélico	Cambio de aa	Significado clínico
7	7	rs17881197	AGA ⇒ AAA	R [Arg] ⇒ K [Lys]	Sin información
8	8	rs7124969	Variante intrónica C/T		Sin información
9	10	rs1055088	Variante 3' UTR	NA ⇒ A	Sin información

En la Tabla 7 se detallan edad, sexo, estadio clínico, cariotipo, FISH, *IGHV* y SLE de cada uno estos pacientes:

**Tabla 7: Características clínicas, citogenéticas e *IGHV* de los pacientes con variantes del gen *BIRC3*.**

Caso	Edad/Sexo	Estadio clínico (Rai)	Cariotipo	FISH	<i>IGHV</i>	SLE (meses)
7	86/M	I	ND	ND	VH1-18-01 M: 92,7%	15
8	77/F	II	46,XX	13q14: 72,9%	ND	39
9	69/F	II	46,XX,del(6)(q21),del(16)(q13)[cp12]/46,XX[5]	+12: 5,35% 13q14: 74,9% 17p13: 35,1%	VH1-74-01 NM: 100%	11

M: masculino; F: femenino; NN: Normal; M: mutado; NM: no mutado; SLE: sobrevida libre de eventos; 13q14: delección 13q14; +12: trisomía 12; 17p13: delección 17p13; ND: no determinado.

En dos pacientes se efectuaron los estudios citogenéticos, FISH e *IGHV*. Uno de los casos presentó un cariotipo patológico con dos marcadores, y mostró evidencia de evolución clonal por FISH, en tanto que el restante presentó un cariotipo normal y delección 13q14 por FISH. El análisis de *IGHV* mostró rearrreglos que involucraron a la familia VH1, uno M y el otro NM.

Los resultados obtenidos indican una muy baja incidencia de mutaciones de *SF3B1* y *BIRC3* en nuestros pacientes con LLC o bien una frecuencia clonal por debajo del límite de resolución de la metodología empleada en el presente estudio, siendo necesario efectuar un abordaje utilizando las nuevas técnicas de secuenciación masiva paralela que presentan mayor sensibilidad. No obstante, resulta interesante el hallazgo de variantes probablemente patogénicas en el gen *SF3B1* con la información disponible al

momento, las que deben ser revisadas periódicamente a fin de confirmar su patogenicidad.

Sin duda la realización sistemática de estos estudios permitirá ahondar en la caracterización biológica de la LLC así como aportar al conocimiento de las causas de la amplia heterogeneidad clínica presente en la patología, integrando las nuevas mutaciones en un perfil de riesgo conjunto con los rearrreglos genómicos asociados a esta entidad.

## Referencias

- Baliakas [P](#), et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015a; 29: 329-36.
- Baliakas P, et al. Prognostic relevance of MYD88 mutations in CLL: the jury is still out. *Blood* 2015b; 126: 1043-4.
- Balatti V, et al. *NOTCH1* mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012; 119: 329-31.
- Burger JA, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse like cell co-cultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009; 113: 3050-8.
- Capaldi IB, et al. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma. *Exp Mol Pathol* 2014; 97: 57-65.
- Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2005; 352: 804-15.
- Dal Bo M, et al. NOTCH1 mutations identify a chronic lymphocytic leukemia patient subset with worse prognosis in the setting of a rituximab-based induction and consolidation treatment. *Ann Hematol* 2014; 93:1765-74
- Damle RN, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7.
- Döhner H, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-6.
- Fabbri G, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; 208: 1389-401.
- Foà R, et al. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013; 98: 675-85.
- Gianfelici V. Activation of the NOTCH1 pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2012; 97: 328-30.

- Haferlach C, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study of 506 cases analyzed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV<sub>H</sub> status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21: 2442-51.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2017; 92: 946-65.
- Hamblin TJ, et al. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
- Jeelall YS, Horikawa K. Oncogene MYD88 mutations drives Toll pathways to lymphoma. *Immunol Cell Biol* 2011; 89: 659-60.
- Lau R, et al. cIAP2 represses IKK $\alpha/\beta$ -mediated activation of MDM2 to prevent p53 degradation. *Cell Cycle* 2012; 11: 4009-19.
- Lionetti M, et al. High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *Br J Haematol* 2014; 165: 629-39.
- Ngo VN, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; 470: 115-9.
- Oscier DG, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013; 121: 468-75.
- Palau Nagore V, et al. Evaluación del significado pronóstico del tamaño del clon con delección 13q14 en pacientes con leucemia linfocítica crónica. *Hematología* 2018; 22: 21-7.
- Puente XS, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475: 101-5
- Quesada V, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 44: 47-52.
- Rai KR, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- Rawlings DJ, et al. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 282-94
- Rose-Zerilli MJ, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11qdeleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica* 2014; 99: 736-42.
- Rossi D, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011; 118: 6904-8.

- Rossi D, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012a; 119: 2854-62.
- Rossi D, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012b; 119: 521-9.
- Sportoletti P, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 2010; 151: 404-6.
- Te Raa GD, et al. The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia* 2015; 29: 1133-42.
- Travella A, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol* 2013; 31: 339-47.
- Treon S, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Eng J Med* 2012; 367: 826-32.
- Van Dyke DL, et al. The Döhner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol* 2016; 173: 105-13.
- Wang L, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2011; 365: 2497-506.
- Whal MC, et al. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 2009; 136: 701-18.
- Winkelmann N, et al. Low frequency mutations independently predict poor treatment-free survival in early stage chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2015; 100: e237-9.
- Xia Y, et al. Frequencies of SF3B1, NOTCH1, MYD88, BIRC3 and IGHV mutations and TP53 disruptions in Chinese with chronic lymphocytic leukemia: disparities with Europeans. *Oncotarget* 2015; 6: 5426-34.
- Zarnegar BJ, et al. Non-canonical NF-kappa B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 2008; 9: 1371-8.
- Zhang Z, et al. SF3B1 mutation is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8: 69916-23
- Zou Y, et al. *NOTCH1* mutation and its prognostic significance in Chinese chronic lymphocytic leukemia: a retrospective study of 317 cases. *Cancer Med* 2018; 7: 1689–96.

## ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a highly heterogeneous disease due to the variety of genetic changes involved in its development. The clinical course of the disease varies from stable to rapidly progressive, with the survival of patients ranging from 1 year to 15 years or more. The analysis of genomic aberrations and the *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*) mutational status are robust prognostic factors in CLL. Recently, next-generation sequencing (NGS) technology revealed previously unknown somatic mutations in different genes, which might represent new biomarkers of prospective clinical relevance in CLL. In the present study, we have assessed the mutational status of *NOTCH1* (*Notch homolog 1, translocation associated*), *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*), *SF3B1* (*splicing factor 3B subunit 1*) y *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat-containing protein 3*) genes in 90 CLL patients. Results were compared with prognostic factors of the disease. To analyze mutational status, we have performed DNA extraction, PCR amplification and bidirectional sequencing. Cytogenetic, FISH (fluorescence in situ hybridization) and *IGHV* analysis were also performed. No mutations of *MYD88* gene were found. The analysis of *NOTCH1* showed two patients with the c.7541\_7542delCT mutation, both cases associated to unmutated *IGHV*, one of them showing trisomy 12 and the other deletion 13q14 by FISH analysis. The evaluation of *SF3B1* and *BIRC3* did not find mutations but showed the presence of different variants: five on exons 14 and 15 of *SF3B1*, three of them probably pathogenics, and three on exons 7, 8 and 10 of *BIRC3* gene. These findings suggest a low incidence of these mutations in our CLL patients or a clonal frequency below of the resolution limit of the methodology employed. Mores studies including large number of patients and using NGS will permit to complete the genetic characterization of our patients.

# IMPACTO DE LAS OBRAS DE RENOVACIÓN HOSPITALARIA SOBRE LA BIOTA FÚNGICA AMBIENTAL, COMO FUENTE DE INFECCIÓN FÚNGICA NOSOCOMIAL

Mariana Soledad Fernández, Gustavo Giusiano

Institución: Instituto de Medicina Regional-Universidad Nacional del Nordeste-  
Departamento de Micología

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha progresado mucho en la construcción / renovación de los servicios de los centros de salud, pero aún existen riesgos relacionados con posibles peligros y contaminantes. Equilibrar los riesgos sanitarios de la calidad del aire interno con el desafiante manejo de los costos de construcción es siempre un desafío. Las estadísticas demuestran que el número de muertes derivadas de infecciones por hongos contraídas en las salas de cuidados especiales alcanza hoy cifras récord<sup>1</sup>. La proporción de pacientes sin neutropenia o inmunosupresión severa que presentan riesgo de contraer una infección fúngica invasiva es más alta de lo que se piensa<sup>2</sup>.

Entre los agentes más destacados se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Stachybotrys*, *Curvularia* y *Scedosporium*. La mayor gravedad se presenta en los lugares de alto riesgo, como guarderías, residencias de ancianos, quirófanos y unidades de terapia intensiva<sup>3</sup>.

En los ambientes internos la proliferación de los contaminantes biológicos (hongos sobretodo) se da en las zonas húmedas, es decir, humedad de las paredes, agua estancada procedente de aparatos de refrigeración, humidificadores, floreros, filtros de aire, alfombras, cortinas de tela, macetas con plantas o pinturas porosas. Por lo tanto, la vigilancia epidemiológica en los hospitales es necesaria para evitar enfermedades producidas por hongos<sup>4,5,6</sup>. Para ello, es imprescindible conocer la calidad del aire confinado, realizando un recuento selectivo de levaduras y de mohos, como el más elemental mecanismo de prevención de enfermedades<sup>3,7,8</sup>. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de las obras de construcción/renovación intrahospitalarias en la carga y diversidad fúngica aérea en el área de quirófanos del Hospital Pediátrico "Avelino Castelán" de la ciudad de Resistencia, Chaco- Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron tomadas en el área de quirófanos, de dicho Hospital. La misma cuenta con tres quirófanos, una sala de inducción y una de recuperación.

La recolección de los propágulos fúngicos se llevó a cabo en tres etapas:

- Etapa 1: muestreo antes de la remodelación del área;
- Etapa 2: muestreo durante la remodelación del área;
- Etapa 3: muestreo después de finalizadas las obras de renovación en el área.

Para ello, se utilizó un colector de aire Surface Air Sampler, P.B.I. International super 100 (SAS). Con el fin de comparar tanto la carga como la diversidad fúngica, se muestrearon paralelamente las salas y el ambiente inmediato a la puerta principal de cada una de ellas, que se consideró como blanco (Bl). En todos los muestreos se siguió un diseño diagonal tomando 3 o 5 puntos de acuerdo a la superficie de los ambientes<sup>9</sup>.

El SAS se colocó a 1,50 metros del suelo y el flujo de aire fue de 100 litros. Como medio de impacto se utilizó agar papa dextrosa con cloranfenicol 250mg/l (PDA/ATB), en placas de Petri de 9mm<sup>9</sup>.

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

Las placas obtenidas de ambos tipos de muestreo se incubaron a 28°C durante 72 hs; al cabo de la cuales se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia por placa (UFC/placa) y se extrapoló a unidades formadoras de colonia por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) según las instrucciones del fabricante<sup>10</sup>. Cada taxa se contabilizó una sola vez en cada muestra, no importando si se repetía en la misma placa o aparecía en las otras.

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

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

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

## RESULTADOS

Etapa pre y post renovación del área de quirófanos (Etapa 1 y 3). Se eligió el horario de muestreo buscando el momento de menor movimiento del personal dentro de las salas y evitando los horarios de visita. Por esto, las muestras se tomaron al mediodía, después de la limpieza habitual de las salas. Además, según lo expuesto en otros trabajos, en este horario la concentración fúngica es mayor.

Etapa durante renovación del área de quirófanos (Etapa 2). Se eligió el horario de muestreo inmediatamente el personal encargado de las obras terminaba su trabajo y se realizaba una limpieza de las salas.

La altura a la que se colocó el Colector SAS super 100 fue 1,50 metros del suelo y se eligió colectar un volumen de 100 litros dado que en todos los muestreos realizados con 400 y 300 litros resultó imposible el recuento e identificación de las colonias, ya que crecían encimadas.

En cada etapa se muestreó el Área de quirófanos que incluye: tres quirófanos, la sala de inducción y sala de recuperación.

En la **Tabla 1** se muestran las UFC/m<sup>3</sup> y las UFC/placa obtenidas en las tres etapas de monitoreo, tanto del área de quirófanos como del ambiente contiguo considerado ambiente blanco.



**Tabla 1. Recuento de UFC/m<sup>3</sup> y UFC/placa obtenidos en las tres etapas de muestreo, tanto del área de quirófanos como del ambiente blanco.**

Zonas de monitoreo	1er Etapa		2da Etapa		3er Etapa	
	(pre-renovación)		(durante renovación)		(post-renovación)	
	UFC/m <sup>3</sup>	UFC/placa	UFC/m <sup>3</sup>	UFC/placa	UFC/m <sup>3</sup>	UFC/placa
Área de Quirófanos	236	20	608	42	204	19
Ambiente externo (blanco)	330	25	913	55	603	45

No se observó diferencia significativa entre los recuentos de UFC/m<sup>3</sup> y de UFC/placa del área de quirófanos y el ambiente blanco en las Etapas 1 y 2 pero sí se observó diferencia significativa entre el recuento de UFC/m<sup>3</sup> y de UFC/placa del área de quirófanos y el ambiente blanco en la etapa 3 del monitoreo.

Por otro lado, se observó diferencia significativa en el recuento de UFC/m<sup>3</sup> y de UFC/placa del área de quirófano y del ambiente blanco de la etapa 2 con respecto a los recuentos de ambas áreas de la etapa 1 y 3.

En total se aislaron 637 colonias de hongos de las que fueron identificados 16 géneros y 35 especies, considerando aire y superficies.

Los géneros más frecuentes en números de especies en los tres muestreos fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*; los cuales representaron el 65% de todos los aislamientos.

Por otro lado se aislaron especies consideradas inaceptables en ambientes internos, potenciales patógenos y productoras de toxinas, como ser: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger complex*, *Acremonium strictum complex*, *Fusarium oxysporum*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida parapsilosis*.

El índice de Shannon durante la Etapa 2, es decir durante las obras de renovación fue de 2,20 para el Área de quirófanos y de 1,99 para el ambiente blanco, sin encontrarse diferencia significativa. En las Etapas 1 y 3 el Índice se mantuvo en esos valores mostrando que aunque el recuento de UFC/m<sup>3</sup> variaba en las tres etapas, la diversidad se mantenía.

## DISCUSIÓN

Si bien la interpretación de los resultados en los muestreos de aire es problemática por una multiplicidad de factores, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la existencia de mohos y levaduras en mayor cantidad que la esperada en tipo de salas muestreadas. En el trabajo de Cerminara se establece que la cantidad de UFC/m<sup>3</sup> no debe sobrepasar las 70 UFC/m<sup>3</sup> en salas de alto riesgo como en los quirófanos en general ni las 400 en las salas de internación común<sup>25</sup>.

Los resultados presentados demuestran la existencia de hongos en el aire en mayor cantidad que los valores indicativos y esperados para un quirófano incluso antes y después de las obras de renovación. Además El número de UFC hallado excedió considerablemente los parámetros

establecidos durante las obras de renovación. Lo que demuestra el impacto que tienen las obras dentro de los hospitales en la biota fúngica interior.

Los géneros más frecuentes de este monitoreo, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*, se encuentran dentro de los microorganismos normalmente presentes en el aire y las superficies<sup>9</sup>. Su sola presencia no representa riesgo para el hombre, pero las cargas elevadas de estos agentes en ambientes internos pueden generar situaciones riesgosas<sup>9</sup>.

Los proyectos de construcción o renovación de áreas en las Instituciones de salud brindan cambios especiales. Por tal motivo el personal de Control de Infecciones debe estar involucrado en todas las fases del proyecto y de esta forma poder asegurar que pacientes, visitas y personal de salud estén protegidos de exponerse a agentes infecciosos, a la vez de permitir satisfacer las necesidades e implementar las medidas de control de infecciones.

La Enfermera en Control de Infecciones, además de evaluar que la estructura física sea funcional, segura, amplia y de fácil limpieza, debe planear las vías para disminuir los riesgos de infección, contemplando las normas, leyes o disposiciones que existan al respecto.

El conocimiento de la prevalencia y la incidencia de especies de hongos anemófilos es importante para la prevención de las complicaciones generadas por su presencia en ambientes cerrados y para alertar sobre la presencia de fuentes de infección. Por esto se espera que los resultados puedan ser transferidos a la comunidad médica, como información válida para la orientación en las medidas de prevención de infecciones fúngicas en las salas de internación o en quirófanos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Zumbado H. Epidemiología y control microbiológico de infecciones. En: Isenberg H.D., editor. Manual de Procedimientos en Microbiología Clínica. <http://www.cariari.vcr.ac.cr/~gacetapc/Epidem-Control.html>, 2004.
- 2.- Hao Z, Ao J, Hao F, Yang R, Zhu H and Zhang. Environment surveillance of filamentous fungi in two tertiary care hospitals in China Jie. Chinese Medical Journal 2011; 124:1970-1975.
- 3.- Flannigan, B. & Miller, D.. Health implications of fungi in indoor environments – an overview. En: Samson RA; Flannigan B; Flannigan ME; Verhoeff AP, Adan OCG, Hoekstra ES, editores. Health implications of fungi in indoor environments. Air quality monographs, 1994; 2: 3-11.
- 4.- Miller, D; Rand, T; Jarvis, B. *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling?. Medical Mycology, 2003; 41: 271 – 291.
- 5.- Spieksma, F; Kramps, J; Van Der Linden, A; Nikkels, B; Plomp, A; Koerten, H; Dijkman, J. Evidence of grass-pollen. Clinical and Experimental Allergy, 1990; 20:273-80.
- 6.- Streifel, A. Hospital Epidemiology and Infection Control. En: Glen Mayhall Editor. Design and Maintenance of Hospital Ventilation Systems and the Prevention of Airborne Nosocomial Infections. USA., 1996; p. 955.
- 7.- Alfano, V.; Visciano, A.; Liguori, G. Aspetti pratici del monitoraggio microbiologico ambientale. Biologia Clinica, 2007; 2:30-34.
- 8.- UNICHIM. Manuale N. 203. Rischio biologico in ambienti “indoor”. Inquadramento della problematica e strategia di controllo e prevenzione. Associazione per l’Unificazione nel Settore dell’industria Chimica. Federata all’UNI. Milano, 2009.
- 9.- Rojas TI, Martínez E, Aira MJ y Almaguer M. (2008). Aeromicota de ambientes internos: Comparación de métodos de muestreo. Boletín Micológico- Vol 23. 67-73.
- 10- Martí Solé, M NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire. [http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp\\_299.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_299.htm). 1993.
- 11- Gams, W. (1971). Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes. G Fisher Verlag. Stuttgart.
- 12- Onions, A.; Allsopp, D. & Eggins, H. (1981). Smiths’s introduction to industrial Micology, 7<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons. New York.

- 13- Von-Arx, J.A. (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. 3<sup>a</sup> ed. Edit J. Crame. Vaduz.
- 14- Hoog, G. & Guarro, J. (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2<sup>a</sup> ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn and Delft.
- 15- Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (2000). Introduction to food and airborne fungi. Utrcht. Centraalbureau voor Shimmelcultures. The Netherlands.
- 16- Rifai, M.A. (1969). A Revision of the Genus *Trichoderma*. Mycological Papers N° 116
- 17- Bissett, J. (1991). A Revision of the Genus *Trichoderma*. H. Infrageneric classification, Can. J. Bot. 69:2357-2372.
- 18- Piontelli, E. & Toro, M.A. (1994). Manual de identificación para microhongos comunes en alimentos. Universidad de Valparaíso. Escuela de medicina. Cátedra de Micología. Valparaíso.
- 19- Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological papers, N° 158. C.A.B. Internatinal Mycological Institute.
- 20- Pitt, J.I.(1986). A laboratory guide to common *Penicillium* species, Reprinted. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of food Reserch.
- 21- Ellis, M.B. & Ellis, J.P. (1987). Microfungi on land plants. An identification handbook. Croom Helm. Australia.
- 22- Klich, M.A. & Pitt, J.I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Reprinted. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of food Processing. Australia.
- 23- Carmichael, J.;Kendrick, B.; Connors, I.; Sigler,L. (1980). General of Hyphomycetes. The University of Alberta Press. Canada.
- 24- De Hoog & Hermanides-Nijhof (1977). The black yeasts and allied hyphomycetes.
- 25-Cerminara R.H, (2000) Control del aire en los Hospitales. [www.enfermeria21.com/listametas.doc](http://www.enfermeria21.com/listametas.doc)

## ABSTRACT

The aim of this work was to study the airborne fungi of Operating Room of Pediatric Hospital `Avelino Castelán` of Resistencia city (Chaco-Argentina) during the renovation works.

The sampling was performed before, during and at the end of renovation works by sprinkling method and volumetric equipment.

The results presented demonstrate the existence of fungi in the air in greater quantity than the values indicated and expected for an operating room, even before and after the renovation works.

Also, the number of Colony Forming Units per cubic meter found considerably exceeded the established parameters during the renovation works, which demonstrates the impact of the works inside hospital in the indoor airborne fungi.

The most frequent genera isolated during all the sampling were: *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium*. Pathogenic and toxicogenic species considered unacceptable in indoor environments were detected.

Construction projects in health institutions provide special changes, but it must be possible to ensure that patients, family members and health personal are protected from exposure to infectious agents. It is expected that the results can be transferred to the medical community as valid information for guidance in the prevention of fungal infections.

# RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ASOCIADA A LA PRESENCIA DE MUTACIONES Y EXPRESIÓN ALTERADA DE GENES EN LEUCEMIAS PHILADELPHIA (+)

Cristian Alberto Ferri y María Mercedes Formichela

Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis), Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN), Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Ruta Nacional N°12 Km 7.5, Miguel Lanús, 3304 Posadas, Misiones, Argentina

## INTRODUCCIÓN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica caracterizada por la expansión clonal de células hematopoyéticas. Representa el 20% de las leucemias del adulto [1, 2]. La LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma *Philadelphia* (Ph), que resulta de la translocación recíproca y balanceada entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)]. La consecuencia molecular de esta translocación es un gen de fusión denominado *BCR-ABL1*, que codifica una proteína tirosina quinasa homónima constitutivamente activa [3]. La actividad desregulada de esta oncoproteína quimérica genera un incremento en la proliferación celular y resistencia a la apoptosis [4]. La consecuencia molecular de la proteína de fusión BCR-ABL1 es la hiperactividad del dominio tirosina quinasa de ABL1. Las células que expresan la oncoproteína muestran fosforilación aberrante de múltiples proteínas, incluyendo proteínas adaptadoras del citoesqueleto y factores de transcripción. La quinasa BCR-ABL1 conduce directa o indirectamente a la activación de múltiples vías celulares incluyendo PI3K, AKT, MTOR, RAS, EGFR, MAP-quinasa, JNK/SAPK, JAK1-3, SRC-quinasas como LYN, FYN, HCK, y FGR, PTPN11, NF-kB, fosfolipasa C y STAT5 [5].

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Evaluar la asociación de los reordenamientos moleculares *b2a2* y *b3a2* en los mecanismos de resistencia asociados a inhibidores de tirosina quinasa de primera y segunda generación.
- Determinar la sobreexpresión de los genes *HCK* y *FYN* como predictores de recaídas al tratamiento con ITKs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Expresión de *HCK* y *FYN* mediante PCR en tiempo real

Se siguió un esquema de trabajo del tipo Casos y Controles (retrospectivo - observacional - analítico) para evaluar si la sobreexpresión de los genes de SRC-quinasas *FYN* y *HCK* está asociada a la resistencia a los ITKs en pacientes con LMC.

El proyecto se llevó a cabo utilizando muestras biológicas de 75 pacientes con LMC entre 20-70 años, de ambos sexos, distribuidos en dos grupos: 40 pacientes resistentes a los ITKs (LMC-R) y 35 pacientes con LMC con respuesta óptima (LMC-RO) a la terapia,

ambos grupos fueron reclutados en el Laboratorio de Genética Hematológica del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (IMEX-CONICET-ANM), previo consentimiento informado y cumpliendo con todas las normas bioéticas nacionales e internacionales y preservando el anonimato de los pacientes. Como grupo control, se obtuvieron muestras de 50 individuos sanos (IS) de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20-70 años.

El presente trabajo avalado por el Comité de Ética del Hospital de Pediatría de Posadas Dr. Fernando Barreyro.

### **Tipos de muestra**

El material genético (ARN) de los pacientes con LMC y de los individuos sanos, se obtuvo a partir de sangre periférica (2-4 ml) anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Para la obtención de leucocitos totales se partió de 2-4 ml de sangre periférica, se utilizó TRIReagent® (Sigma-Aldrich®) para la posterior extracción del ARN total, siguiendo el protocolo de extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo [6].

### **Reacción de Retrotranscripción (RT-PCR)**

La obtención del ADNc, se realizó a partir de 1µg de ARN en un volumen final de 20µl. A cada 1µg de ARN se le agregó 25 pmol de *random primers* y se sometió a 65°C durante 5 minutos, luego se añadió a la mezcla de reacción: dNTPs, enzima transcriptasa reversa (M-MLV de Promega®) y *buffer* de reacción. Se RT-PCR se llevó a cabo durante una hora a 37°C y 10 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

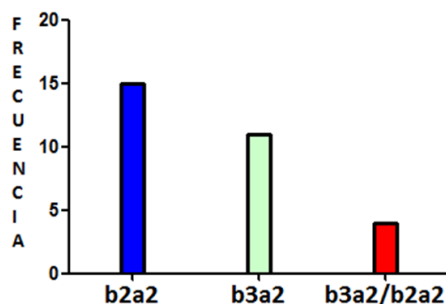
### **Amplificación de cDNA mediante PCR en Tiempo Real**

La cuantificación relativa de los transcritos de *FYN* y *HCK* se realizó por PCR en Tiempo Real utilizando un intercalante de ADN doble cadena (EvaGreen®, a la longitud de onda de 530nm) y utilizando como control al gen *GAPDH*. Los *primers* de *FYN* y *HCK* se diseñaron a través del software OLIGO 6® (Molecular Biology Insights®) y los de *GAPDH* fueron tomados de Hu *et. al* 2004. Las reacciones se realizaron en el termociclador BIOER-Line Gene K Real Time, modelo FDQ-48A (A4).

## **Resultados**

### **Caracterización del tipo de transcrito en pacientes con LMC resistentes a ITKs**

A partir del procesamiento de las muestras y posterior electroforesis en gel de agarosa se observó que el 50% de los pacientes de la población estudiada presentaban transcritos b2a2. El 37,5% de los pacientes presentaban el rearreglo b3a2 y en un 12,5% se observó ambos transcritos [Figura 1].



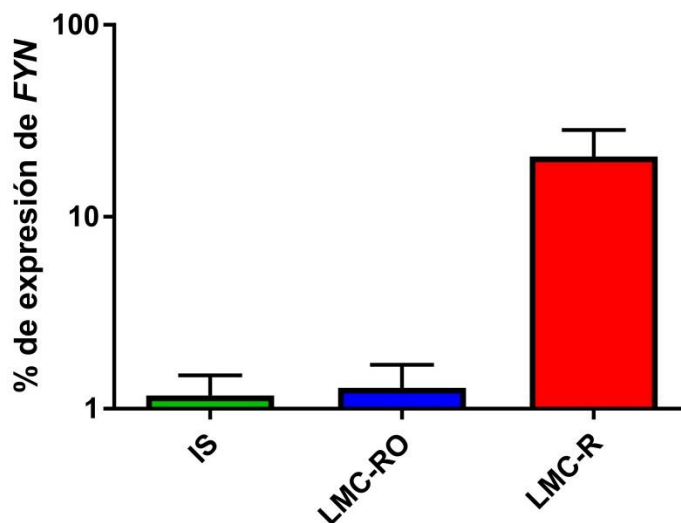
**Figura 1:** Distribución de los transcritos (b2a2/b3a2) en la población analizada

En los pacientes que presentaron transcritos b2a2, se observó que el 40% estaba bajo tratamiento con Dasatinib, mientras que el 60% con Nilotinib. La mayoría de este grupo poseía mutaciones conocidas del dominio quinasa del *BCR-ABL1*. Dos pacientes se encontraban en FA al momento del estudio, uno de los cuales no presentaba mutaciones. Con respecto a los que poseían transcritos b3a2 el 55% se encontraba en tratamiento con Dasatinib, mientras que el 45% estaban tratados con Nilotinib. La mayoría poseía mutaciones conocidas del *BCR-ABL1*. Por último, el 75% de los pacientes con los transcritos b2a2 y b3a2, estaban en tratamiento con Dasatinib; mientras que, el 25% restante recibía Nilotinib. En este caso, la mayoría no presentaron mutaciones conocidas en el *BCR-ABL1*.

### **Análisis de expresión de *FYN* y *HCK***

#### **Expresión de *FYN***

Los resultados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *FYN* en los pacientes resistentes con respecto a los individuos sanos (valor-p=0,0157) y a los respondedores óptimos (valor-p=0,0163). No se observaron diferencias significativas entre los respondedores óptimos y los individuos sanos (valor-p=0,8352), estos resultados sugieren que los pacientes con buena respuesta a la terapia con ITKs presentan valores de expresión de *FYN* comparables a los IS. Por lo tanto, la sobreexpresión de *FYN* fue observada únicamente en los pacientes con LMC resistentes a los ITKs [Figura 2].



**Figura 2.** Medias de niveles de expresión de *FYN* expresados en porcentaje (IS: 1,17%; LMC-RO: 1,28%; LMC-R: 20,61%) con sus respectivos errores estándar. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo LMC-R con respecto a los grupos IS y LMC-RO (valores  $p=0,0157$  y  $p=0,0163$ , respectivamente). IS: individuos sanos. LMC-RO: pacientes con LMC que responden óptimamente al tratamiento con ITKs. LMC-R: pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITKs.

### **Identificación de pacientes con sobreexpresión de *FYN* y su asociación con la resistencia a los ITKs**

Para determinar un valor que permitiera identificar cuáles de los pacientes dentro del grupo LMC-R presentaban sobreexpresado *FYN* con respecto al grupo control, se calculó un valor de corte a partir del grupo IS teniendo en cuenta la media ( $X$ ) y desvío estándar ( $SD$ ):  $X + 2SD = 1,175 + 2(2,031) = 5,236$ . Según este criterio, dentro del grupo de pacientes LMC-R, 13 individuos (33%) presentaron sobreexpresión de *FYN* (valores de expresión superiores a 5,236%). Dentro del grupo de pacientes LMC-RO sólo en dos individuos (5%) se observó sobreexpresión del gen *FYN*.

De esta forma, el análisis de expresión de *FYN* pudo explicar la resistencia a los ITK en un 33% de los casos y podría ser utilizado como un indicador de resistencia en los pacientes con LMC con o sin mutaciones y falta de respuesta a la terapia.

Para medir de un modo probabilístico si existe asociación entre la sobreexpresión de *FYN* y el desarrollo de resistencia a la terapia se llevó a cabo el cálculo del Odds Ratio (OR) entre pacientes resistentes (LMC-R) y respondedores óptimos (LMC-RO). El resultado fue un valor  $OR=1,571$  con los valores de límite inferior y límite superior mayores a la unidad (1,214 – 2,034), lo cual indicaría asociación positiva de que la sobreexpresión de *FYN* es un factor de riesgo como mecanismo de resistencia independiente de *BCR-ABL1* en los pacientes LMC-R.

### **Asociación de la expresión de *FYN* con la presencia de mutaciones en el gen *BCR-ABL1***

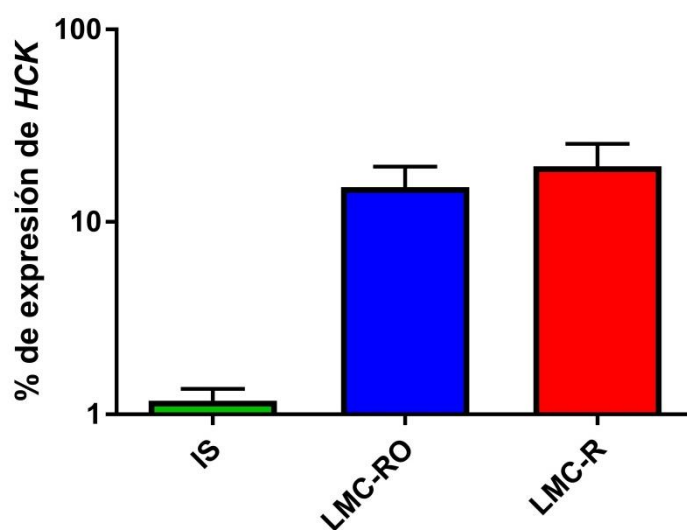
Para evaluar la asociación de la sobreexpresión de *FYN* y la presencia de mutaciones en *BCR-ABL1*, se tuvieron en cuenta aquellos pacientes que presentaron valores superiores al punto de corte de expresión relativa. De los 13 pacientes con sobreexpresión de *FYN* sólo 6 (46%) presentaban mutaciones, de las cuales dos casos correspondió a la mutación T315I que confiere resistencia al tratamiento con ITKs de primera y segunda generación. Las mutaciones representan mecanismos de resistencia dependientes de *BCR-ABL1* por lo cual no se esperaba sobreexpresión de *FYN* en estos pacientes; sin embargo al analizar cada caso en particular 5 de ellos, a pesar del cambio de terapia en función de la mutación detectada, no respondieron al tratamiento. Por lo cual, la sobreexpresión de *FYN* podría representar un mecanismo asociado a la mutación en *BCR-ABL1* en estos pacientes.

### **Análisis de expresión de *HCK***

El análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las medias de los niveles de expresión de *HCK*, fueron similares al realizado para el gen *FYN* (ANOVA de un factor con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ ). El resultado del análisis arrojó un valor  $F=5,36$  (valor- $p=0,006$ ). Al igual que en el análisis de *FYN*, se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias, concluyendo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *HCK* de los grupos de pacientes analizados (IS, LMC-RO y LMC-R).



Se procedió entonces a realizar el *t-test* de Student (*t-test*) de forma similar al análisis en *FYN*, para evaluar si la expresión de *HCK* podría estar implicada en la resistencia al tratamiento, comparando la expresión de pacientes LMC-R con respecto a IS y a pacientes LMC-RO. El *t-test* realizado fue para muestras independientes, con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ . Al igual que en el análisis de *FYN*, los resultados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *HCK* de los pacientes resistentes con respecto a los individuos sanos (*valor-p*=0,0041). A diferencia del análisis de *FYN*, para *HCK* se observó una diferencia estadística significativa entre los respondedores óptimos y los individuos sanos (*valor-p*=0,0026); mientras que entre los pacientes resistentes y respondedores óptimos no se observaron diferencias significativas (*valor-p*=0,5627). Por lo tanto, la sobreexpresión de *HCK* fue observada en ambos grupos de pacientes con LMC (LMC-R y LMC-RO) [Figura 3].



**Figura 3.** Medias de niveles de expresión de *HCK* expresados en porcentaje con sus respectivos errores estándar. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo LMC-R con respecto a IS (*valor-p*=0,0041) y entre LMC-RO con respecto a IS (*valor-p*=0,0026). Entre los grupos LMC-R y LMC-RO no se observaron diferencias significativas (*valor-p*=0,5627). IS: individuos sanos. LMC-RO: pacientes con LMC que responden óptimamente al tratamiento con ITKs. LMC-R: pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITKs.

### Identificación de pacientes con sobreexpresión de *HCK* y su asociación con la resistencia a los ITKs

El valor de corte fue calculado a partir del grupo IS teniendo en cuenta su media ( $X$ ) y desvío estándar ( $SD$ ):  $X + 2SD = 1,175 + 2(1,155) = 3,485$ . Según este criterio, dentro del grupo de pacientes LMC-R, 17 individuos (43%) presentaron sobreexpresión de *HCK*. Dentro del grupo de pacientes LMC-RO también se observó un porcentaje similar de sobre expresión con 15 individuos de 35 (43%). Al excluir del análisis a los pacientes LMC-RO con RMMa, el porcentaje de sobreexpresión detectada en este grupo correspondió a un 20%.

El resultado de la asociación de sobreexpresión de *HCK* con la resistencia a los ITKs, no fue significativo ( $OR=1,714$  con valores de límite inferior y límite superior menores a la unidad), por lo cual, se rechaza la probabilidad de que la resistencia se deba a la sobreexpresión de este gen.

## Conclusión

El desarrollo o la aparición de resistencia al tratamiento con ITKs en la LMC se deben a diversos factores. El más estudiado es la presencia de mutaciones en el dominio quinasa del *BCR-ABL1*. Sin embargo, existen numerosas publicaciones que demuestran la necesidad de estudiar otras causas de resistencia [7-10].

La LMC, en la mayoría de los casos, puede presentarse con dos tipos de transcritos, generando la misma sintomatología y evolución natural ya sea si presenta uno de ellos o ambos a la vez. Pocos trabajos han estudiado si la presencia de uno u otro podría estar relacionado a la evolución de la enfermedad pos tratamiento. En el presente trabajo, se investigó la posible relación entre estos transcritos y la resistencia al tratamiento con ITKs de segunda generación. Un 50% de la población estudiada poseía el reordenamiento molecular b2a2 (e13a2) de *BCR-ABL1*<sup>p210</sup>. Al igual que lo reportado en la bibliografía, es posible que la presencia de transcritos b3a2 sólo o acompañado de b2a2, está asociado a una mayor eficacia del tratamiento con ITKs y la presencia de transcritos b2a2 le confiere peor pronóstico.

Con respecto a la asociación de los genes *FYN* y *HCK* en pacientes con LMC, se puede concluir que la sobreexpresión de *FYN* en pacientes con LMC se asoció a la resistencia al tratamiento con ITKs; mientras que la sobreexpresión de *HCK* se observó en individuos con LMC resistentes y con respuesta óptima a la terapia, por lo cual no pudo asociarse a la resistencia al tratamiento con ITKs.

## Agradecimientos

A la Dra. Irene Larripa y la Dra. Raquel Bengió del Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (IMEX-CONICET-ANM). Sin su valioso aporte el presente trabajo no hubiera podido llevarse a cabo.

## Bibliografía

1. Olofsson T, Odeberg H, Olsson I: **Granulocyte function in chronic granulocytic leukemia. II. Bactericidal capacity, phagocytic rate, oxygen consumption, and granule protein composition in isolated granulocytes.** *Blood* 1976, **48**(4):581-593.
2. Poh AR, O'Donoghue RJ, Ernst M: **Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells.** *Oncotarget* 2015, **6**(18):15752.
3. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM: **Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.** *New England Journal of Medicine* 2006, **355**(23):2408-2417.
4. Quintás-Cardama A, Cortes J: **Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia.** *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2009, **113**(8):1619-1630.
5. Bernt KM, Hunger SP: **Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.** *Frontiers in oncology* 2014, **4**:54.
6. Chomczynski P: **A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.** *Biotechniques* 1993, **15**(3):532-534, 536-537.
7. Weisberg E, Griffin JD: **Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines.** *Blood* 2000, **95**(11):3498-3505.
8. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD: **Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia.** *Nature Reviews Cancer* 2007, **7**(5):345.
9. Mathisen MS, Kantarjian HM, Cortes J, Jabbour E: **Mutant BCR-ABL clones in chronic myeloid leukemia.** *Haematologica* 2011, **96**(3):347.
10. Apperley JF: **Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia.** *The lancet oncology* 2007, **8**(12):1116-1128.

## ABSTRACT

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs), imatinib, nilotinib and dasatinib, are the current treatment of chronic myeloid leukemia (CML). BCR-ABL1 point mutations are the principal cause of resistance to treatment; however other mechanisms could be involved in failure to TKI therapy. FYN and HCK are proteins that regulate survival and responsiveness of tumor cells by a BCR-ABL1 independent mechanism. In this study we evaluated the expression of *FYN*, *HCK* and the b2a2/b3a2 transcript in 50 healthy donors (HD) and in 75 CML patients; 40 of them resistant to TKI in different phases of disease and 35 in chronic phase classified as optimal responders (OR) to TKI. When we analyzed the gene expression values of *FYN*, a significant increase was observed in the group of resistant patients ( $p=0.0157$ ). The overexpression of *FYN* was found to be associated with BCR-ABL1 independent mechanism risk, OR (95% CI) 1.571 (1.214 – 2.034)  $p<0.05$ . The *HCK* expression showed an increase in the group of CML patients respect to HD ( $p=0.0041$ ) and OR *versus* HD ( $p=0.0026$ ).

The transcribed b2a2 accounted for 50% of the resistant patients, the b3a2 represented the 37.5% and both (b2a2/b3a2) was observed in the 12% of this population.

In addition we were able to identify overexpression in 13 (33%) of the resistant cases, in which resistance could be associated with an increase in the *FYN* expression. The *HCK* overexpression was observed in 17 resistant patients (43%), but overexpression was also observed in 15 OR patients (43%).

Our data suggest that the *FYN* expression may be a sensitive monitor of disease progression in CML resistant patients under ITK treatment.

# PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR LOS VIRUS BK Y JC EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON VIH DE CÓRDOBA

María Celia Frutos; Macarena Albizúa Verdinelli, Marcos Balangero; Sebastián Blanco; Sandra Gallego

Instituto de Virología “Dr. José María Vanella”. Facultad de Ciencias Médicas.  
Universidad Nacional de Córdoba

## Introducción

Los humanos son hospedadores naturales de los virus JC (JCV) y virus BK (BKV), pertenecientes a la familia Polyomaviridae<sup>1</sup>. La infección primaria ocurre en la infancia, pudiendo permanecer latentes en células uroteliales, linfocitos B o en tejidos como riñón, bazo y cerebro<sup>2</sup>.

En individuos inmunocompetentes estos virus no resultan patógenos y permanecen latentes, pudiendo reactivarse sin manifestar sintomatología. Sin embargo, la reactivación en individuos inmunocomprometidos puede llevar a complicaciones severas.

Los avances en las terapias antirretrovirales aplicadas a los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) han mejorado la sobrevida de estos pacientes, y ha traído como consecuencia la posible aparición de reactivaciones de infecciones por parte de patógenos oportunistas, como BKV y JCV.

JCV se caracteriza por su neurotropismo y su reactivación puede conducir a la lisis de oligodendrocitos, enfermedad denominada Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP), la cual se desarrolla en pacientes con inmunodeficiencia celular<sup>3</sup>. Al BKV se lo ha descrito en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas y renal<sup>4</sup>. Debido a su capacidad de lisis, la reactivación de BKV en estos pacientes puede producir patologías como cistitis hemorrágica, nefropatía, en menor frecuencia neumonía y encefalitis<sup>5</sup>.

En nuestro país, hay reportes de prevalencia de BKV en individuos trasplantados<sup>6,7</sup> y de JCV en LCR de pacientes VIH que presentaban LMP<sup>8</sup>, sin embargo, no hay estudios de prevalencia de las infecciones por BKV y JCV en poblaciones VIH en Argentina.

## Objetivo

Aportar al conocimiento de las infecciones por patógenos oportunistas en pacientes VIH-1 de Córdoba, mediante la determinación de la prevalencia de JCV y BKV.

## Materiales y Métodos

Se estudiaron muestras de sangre periférica de 107 pacientes VIH-1 de Córdoba criopreservadas en el Laboratorio de Virus Linfotrópicos Humanos del Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, FCM-UNC.

Las muestras fueron codificadas con las letras MA seguido de un número en orden ascendente. La población fue subdividida por sexo y grupos etarios para su estudio.

En los pacientes positivos para Poliomavirus, se analizó el perfil epidemiológico, parámetros bioquímicos y carga viral de VIH-1.

A cada muestra se la sometió a una extracción de ADN utilizando el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) para realizar los siguientes ensayos:

**PCR Antígeno T (Ant T) Poliomavirus:** se amplificó de un fragmento genómico de la región del antígeno T compartido por JCV y BKV, siguiendo el protocolo previamente descrito<sup>9</sup>.

**Nested-PCR JCV-BKV:** las muestras positivas para el Ant. T fueron sometidas a una Nested-PCR dirigida a una región parcial del gen Ant. T y VP1, siguiendo el protocolo previamente descrito<sup>10</sup>.

La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados de Ant. T fueron enviados a secuenciar a Macrogen, Inc. para la tipificación viral. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa ClustalX (Conway Institute UCD Dublin, Dublín, Irlanda).

Los datos fueron procesados y se realizaron pruebas de Mann Whitney y Chi cuadrado, utilizando el programa R-Medic<sup>11</sup>. En todos los casos el nivel de significación fue del 5%.

## Resultados

Se analizaron 107 muestras de pacientes VIH de Córdoba (8,9% masculino y 41,1% femenino). La media de edad fue de 42,7 años (rango: 25-68 años).

La prevalencia de Poliomavirus en los pacientes VIH-1 de Córdoba fue de **9,35%** (10/107). En una muestra se detectó co-infección para JC y BK por Nested-PCR. Por análisis de las secuencias se identificó JCV en 5,6% (6/107) y BKV en 2,8% (3/107) de las muestras positivas para Ant. T de Poliomavirus (Tabla 1).

**Tabla 1.** Prevalencia de BKV y JCV por sexo en la población VIH-1.

<b>Pacientes infectados con VIH-1</b>			
	<b>Femenino</b>	<b>Masculino</b>	<b>Total</b>
<b>Poliomavirus</b>	<b>Nº de positivos/total (%)</b>	<b>Nº de positivos/total (%)</b>	<b>Nº de positivos/total (%)</b>
<b>JCV</b>	4/43 (9,3%)	2/64 (3,1%)	6/107 (5,6%)
<b>BKV</b>	1/43 (2,3%)	2/64 (3,1%)	3/107 (2,8%)
<b>BKV y JCV</b>	0/43 (0,0%)	1/64 (1,6%)	1/107 (0,93%)

La edad promedio de los pacientes infectados con Poliomavirus fue de 42,73 años (SD=9,92). No se observaron diferencias en la edad entre los pacientes infectados con Poliomavirus y los no infectados (p=0,2393).

En el análisis de las secuencias del Ant. T de JCV y BKV en los pacientes VIH-1 se observó que, presentaron una alta homología con respecto a las secuencias patrones (Figura 1 y Figura 2).

Todas las secuencias del Ant. T de JCV de los pacientes VIH-1 presentaron una delección en la posición 4424 con respecto a la secuencia patrón MAD-1 y a otras secuencias presentes en GenBank. Dicho polimorfismo podría constituir un marcador de cepas locales.

```

4291
MAD-1  GTGGGGTAGA GTGTTGGGAT CCTGTGTTTT CATCATCACT GGCAAACATT TCTTCATGGC AAAACAGGTC TTCATCCC
MA35   ...T..... ..G..... ..G...T.....
MA84   .G.....
MA85   .....
MA87   .....
MA89   .G.....
MA92   ...T.....A... ..C...G ..TC ..T.....

MAD-1  ACTTCTCATT AAATGTATTC CACCAGGATT CCCATTCATC TGTTCATAG GTTGGCACC
MA35   C.....
MA84   .....
MA85   .....
MA87   .....
MA89   .....
MA92   C....T... ..G..... ..C..TG. ....A.....

```

4430

**Figura 1.** Alineamiento de 139 nucleótidos gen Ant. T de JCV. MAD-1: secuencia patrón JCV. MA35, MA84, MA85, MA87, MA89 y MA92: pacientes VIH-1 y JCV. La flecha indica una delección en la posición 4424.

```

4291
DUNLOP GTGGTGTGGA GTGTTGAGAA TCTGCTGTTG CTTCTTCATC ACTGGCAAAC ATATCTTCAT GGCAAAT
MA32   .....G..
MA43   ..TCTCA.. .A.CC... ..G..... ..G..... ..T... ..T.....
MA93   .....G.. ..T.....

DUNLOP AAATCTTCAT CCCATTTTTT ATAAAGGAA CTCCACCAGG ACTCCCACTC TTCTGTTCCA TAGGTTGGCA CC
MA32   .....G
MA43   .....C..... ..C.T. T..... .T....T..
MA93   .....C. ....G ..G... C...T... .G.....

```

4430

**Figura 2.** Alineamiento de 139 nucleótidos gen Ant. T de BKV. DUNLOP: secuencia patrón BKV. MA32, MA43 y MA93: pacientes VIH y BKV.

### Caracterización clínica, virológica e inmunológica de los pacientes VIH-1 de Córdoba

Los pacientes infectados con Poliomavirus presentaron una media mayor de linfocitos T CD4+ y T CD8+, pero no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2). Además, la media del % de linfocitos T CD8+ fue levemente más alta en los pacientes sin Poliomavirus, sin diferencia significativa (Tabla 2).

**Tabla 2.** Recuento de linfocitos T CD4+ y T CD8+ de pacientes VIH-1 de Córdoba, positivos y negativos para Poliomavirus.

	Linfocitos T CD4+				Linfocitos T CD8+			
	%		Cel/mm3		%		Cel/mm3	
	Media	P	Media	p	Media	p	Media	P
<b>Pacientes VIH-1 negativos para Poliomavirus</b>	22,15	0,68	492,26	0,185	47,5	0,764	1055,8	0,507
<b>Pacientes VIH-1 positivos para Poliomavirus</b>	24,4		595,2		46,3		1163,9	

Tres pacientes positivos para JCV presentaron menos de 500 linfocitos T CD4+ cel/mm3 y uno de los pacientes positivos para BKV presentó menos de 500 linfocitos T CD4+/mm3. La media de la relación T CD4+/CD8+ fue ligeramente mayor que en los pacientes negativos para Poliomavirus, siendo la diferencia no significativa (p=0,517). En los pacientes positivos para Poliomavirus con cargas detectables para VIH-1, la media de la carga viral fue mayor que en los pacientes negativos para Poliomavirus, pero la diferencia encontrada no fue significativa (Tabla 3).

**Tabla 3.** Media de carga viral de VIH-1 en pacientes de Córdoba según presencia de Poliomavirus.

Pacientes infectados con VIH	Carga Viral de VIH-1 (copias/ml)	
	Media	p
<b>Positivos para Poliomavirus</b>	<b>22014,9</b>	<b>0,744</b>
<b>Negativos para Poliomavirus</b>	<b>10900,5</b>	

El análisis de las historias clínicas de los pacientes VIH-1 reveló que el 50% de los pacientes positivos para Poliomavirus refirió haber interrumpido la terapia antirretroviral en algún momento del tratamiento.

Uno de los pacientes positivos para BKV, había interrumpido el tratamiento 6 meses previos a la toma de la muestra, debido al desarrollo de resistencia a los fármacos antirretrovirales. Tuvo un síndrome meníngeo inespecífico y fue tratado empíricamente para Criptococosis Meníngea.

La historia clínica del paciente en el que se detectó la co-infección con JCV y BKV, reveló interrupciones en el tratamiento antirretroviral, hasta que logró adherencia en el año 2010.

Al momento de la toma de la muestra para Poliomavirus, los pacientes no se encontraban cursando cuadros clínicos neurológicos o nefrológicos.

## Discusión

En este trabajo presentamos evidencia molecular de infección por JCV y BKV en individuos VIH-1 de Córdoba. La prevalencia de Poliomavirus fue de 9,3% (10/107), habiéndose detectado JCV (5,6%), BKV (2,8%) y una coinfección JCV/BKV (0,93%). En nuestro conocimiento, no hay datos publicados para Argentina sobre prevalencia de Poliomavirus en sangre de pacientes VIH-1.

Diversos estudios han reportado prevalencias de JCV y BKV en sangre muy diversas, 13,5%-89% para JCV y 4,76%-62,5% BKV<sup>12-15</sup>. Si bien las prevalencias en nuestro

estudio son menores que en estos estudios, esto podría deberse a la diferencia en la cantidad de muestras estudiadas, a la etapa de infección por VIH-1 en la que se encontraban los pacientes y a la clínica que presentaban los pacientes al momento de los estudios. Las discrepancias en las prevalencias de JCV y BKV reportadas en los diferentes estudios podrían deberse también a la ausencia de protocolos estandarizados para el diagnóstico de estos virus.

Los Poliomavirus se detectaron en pacientes VIH-1 desde los 25 a 68 años y se observaron las mayores prevalencias de infección en los rangos etarios de 21-30, 61 a 70 y 31-40 años, sin asociaciones significativas con la edad de los pacientes. Estos resultados están en concordancia con lo descrito previamente<sup>16</sup>.

En este estudio no se encontró asociación entre el sexo y la presencia de Poliomavirus en sangre de pacientes VIH-1, contrario a lo descrito en orina, donde la mayor prevalencia se ha descrito en individuos masculinos<sup>1,17</sup>.

En concordancia con lo reportado por otros autores, no encontramos asociación entre el recuento de linfocitos T CD4+, T CD8+ y la detección de Poliomavirus en los pacientes VIH-1<sup>3,18</sup>. De la misma manera, encontramos una media mayor en la relación de los linfocitos T CD4+/CD8+ en los individuos VIH-1 Poliomavirus positivos, pero sin diferencias significativas. Estos resultados corroboran lo publicado previamente, donde la depleción de linfocitos T CD4+/CD8+ no aumenta el riesgo de infección por Poliomavirus en pacientes VIH-1<sup>3</sup>. La razón por la cual el sistema inmune de los pacientes con VIH-1 no puede controlar la infección por Poliomavirus a pesar de los altos recuentos de linfocitos T CD4+ y CD8+, requiere de mayores estudios.

En concordancia con lo previamente reportado<sup>3,18</sup>, no hubo asociación entre la presencia de Poliomavirus en sangre y la carga viral de VIH-1.

El análisis de las historias clínicas mostró que el 50% de los pacientes positivos para Poliomavirus refirieron haber interrumpido la terapia antirretroviral en algún momento del tratamiento.

Si bien, al momento de este estudio los pacientes no se encontraban cursando ningún cuadro clínico compatible con una infección por Poliomavirus, uno de los pacientes BKV había cursado un cuadro meníngeo inespecífico sin diagnóstico etiológico. Reportes previos asocian al BKV con la producción de cuadros meníngeos<sup>19-21</sup>, por lo cual, es posible que el cuadro que presentó este paciente podría haberse debido a la infección por BKV. La consecuencia clínica de las infecciones por BKV y JCV en pacientes VIH no debería subestimarse y merece una mirada más profunda considerando el diagnóstico de laboratorio de ambas infecciones.

En las últimas décadas ha habido un aumento de pacientes con inmunosupresión, tanto por causas infecciosas como por el empleo de nuevos tratamientos biológicos. Los Poliomavirus se han comportado como patógenos emergentes en este tipo de pacientes<sup>18,22</sup>. Dados los resultados del presente estudio es necesario considerar su estudio en los pacientes VIH que no cumplen el régimen de adherencia al tratamiento antirretroviral o en quienes generan resistencia a los fármacos antivirales.

Es necesario continuar con los estudios de estos Poliomavirus en poblaciones inmunodeprimidas para poder determinar la relevancia clínica y terapéutica del hallazgo en sangre de estos virus.

## Referencias

1. Nali LH, et al. Rev Inst Med Trop San Pablo 2012; 54: 201-205.
2. Garces JC. Oschner J 2010; 10:245-9.



3. Andréoletti L, et al. *J Med Virol* 2002; 66(1):1-7.
4. Egli A, et al. *J Infect Dis* 2009; 199:837-846.
5. Bennett SM, et al. *Microbes Infect* 2012; 14(9):672-83.
6. Schiavelli R, et al. *Transplant Proc* 2014; 46(9):3010-4.
7. Bonaventura R, et al. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37(3):153-5.
8. Giri JA, et AL. *Am Clin Lab* 2001; 20:33-35.
9. Fink MC, et al. *J Infect* 2006; 52(1):30-6.
10. Fedele CG, et al. *J Virol Methods* 1999; 82(2):137-44.
11. Mangeaud A, Elías Panigo DH. *Revista Methodo* 2018; 3 (1): 18–22.
12. Dubois V, et al. *J Neurovirol* 1998; 4:539-544.
13. Tornatore C, et al. *Ann Neurol* 1992; 31(4):454-62.
14. Sundsfjord A, et al. *J Infect Dis* 1994; 169 (3):485-90.
15. Azzi A, et al. *J Neurovirol* 1996; 2(6):411-6.
16. Delbue S, et al. *J Clin Virol* 2010; 47(2):156.
17. Karalic D, et al. *Arch Biol Sci Belgrade* 2014; 66(2), 609-614.
18. Martínez MJ, et al. *Rev chil infectol* 2016; 33(3): 298-302.
19. Behzad-Behbahani A, et al. *Infection* 2003; 31(6):374-8.
20. Rocha A, et al. *Pediatr Transplant* 2014; 18(2):48-51.
21. Vidal JE, et al. *AIDS Res Ther* 2007; 4:13.
22. Cervera C. Moreno A. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25 (5): 345-55.

## **Abstract**

**Objective:** To investigate the prevalence of human polyomavirus (BKV and JCV) infections in peripheral blood of HIV-infected patients from Córdoba.

**Methods:** In a retrospective study, 107 blood samples from HIV-infected patients from Córdoba were tested for JCV and BKV by PCR. Samples were screened for the presence of polyomavirus with primers complementary to the early region of JCV and BKV genome (AgT). JCV were BKV were typified by sequence analysis of Ant T. A nested-PCR for JCV and BKV was performed with primers complementary to Ant T-VP1 genes of each virus. The sequence analysis of Ant T from HIV patients was performed using ClustalW and compared with Pairwise/Blast/NCBI. Analysis of the epidemiological, clinical and virology data was made by the Mann Whitney test and Chi square test using the program R-medic.

**Results:** the overall prevalence of polyomavirus-DNA in the population of study was 10/107 (9.35%). BKV DNA was detected in 3/107 (2.8%) blood samples and JCV DNA was detected in 6/107 (5.6%) samples. Both BKV and JCV DNA were present in 1/107 (0.93%) samples. The average age of the patients infected with polyomavirus was 42.7 years. The HIV viral load's means did not significantly differ among the infected and non-infected polyomavirus groups. Also, in polyomavirus negative patients the mean of T cell CD4+ count and the CD4/CD8+ T ratio were high but not shown in statistically significant.

**Conclusion:** Our study provides first data about polyomavirus prevalence in HIV patients from Argentina. Based on this results it is necessary to consider the polyomavirus study in HIV patients who do not comply with the regimen of adherence to antiretroviral treatment or in those who generate resistance to antiviral drugs.

Further studies of polyomavirus in immunosuppressed populations is are essential to clarify the clinical and therapeutic relevance of the blood finding of the polyomavirus infections.

# HIPOGONADISMO EN LA INFANCIA Y PUBERTAD. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN TESTICULAR DE NIÑOS Y ADOLESCENTES SOMETIDOS A TRATAMIENTOS ONCOLÓGICOS POR PATOLOGÍA PRIMARIA EXTRAGONADAL

María Arozarena de Gamboa, Luis Aversa, Silvina Prada, Marcela E. Gutiérrez, Patricia Bedecarrás, Rodolfo Rey y Romina P. Grinspon

Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE)  
CONICET – FEI – División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

## Introducción

El testículo está formado por los túbulos seminíferos, que contienen células de Sertoli y células germinales, y el tejido intersticial, donde se encuentran las células de Leydig. Las células de Sertoli secretan hormona anti-Mülleriana (AMH) e inhibina B, mientras que las células de Leydig secretan testosterona. La actividad de las células de Sertoli es regulada principalmente por la FSH y la testosterona, mientras que la actividad de las células de Leydig es regulada esencialmente por la LH. A su vez, la inhibina B y la testosterona son los principales factores en la retroalimentación negativa de la secreción hipofisaria de FSH y LH. En condiciones normales, las gonadotropinas y la testosterona séricas están altas hasta 3 a 6 meses después del nacimiento, cayendo luego a valores muy bajos. En cambio, las células de Sertoli se mantienen activas, secretando AMH e inhibina B. Al inicio de la pubertad, se reactiva la secreción de LH y FSH. Aumentan la testosterona y la inhibina B, disminuyendo la producción de AMH.

En el varón, el hipogonadismo se caracteriza por la disminución de la función testicular, que puede reflejarse en una deficiente secreción hormonal (andrógenos, INSL3, AMH, inhibina B) y/o una insuficiente producción de espermatozoides con capacidad fecundante. Dado los cambios que ocurren en la fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-testicular desde la vida fetal hasta la adultez, los cuadros de hipogonadismo varían tanto en su fisiopatología como en su presentación clínica según: a) el nivel del eje hipotálamo-hipófiso-testicular primariamente afectado; b) las poblaciones celulares testiculares cuya función está primariamente afectada, y c) el período de la vida en que se establece el hipogonadismo <sup>(1)</sup>. De acuerdo con el nivel del eje hipotálamo-hipófiso-testicular primariamente afectado, el hipogonadismo puede ser central, cuando la falla gonadal es resultado de una disfunción hipotálamo-hipofisaria; primario, cuando existe una falla testicular primaria; o combinado, como en ciertas patologías que afectan concomitantemente el eje hipotálamo-hipofisario y el testículo. Según la población celular cuya función está primariamente afectada, puede haber un hipogonadismo con falla testicular generalizada o con falla de una población celular específica (Sertoli, Leydig, germinales). Finalmente, según

el período de la vida en que se establece, el hipogonadismo puede ser de comienzo fetal, infantil, puberal, del adulto, o tardío.

La evaluación de la función testicular se ha basado clásicamente en la valoración de la espermatogénesis, a través del estudio del semen, y de los niveles circulantes de testosterona. Dicho enfoque es adecuado en el adulto pero inadecuado antes de la pubertad. De hecho, debido a que durante la mayor parte de la infancia las gonadotrofinas y la testosterona circulantes son muy bajas y que los cambios en el volumen testicular son imperceptibles clínicamente, se ha calificado al testículo infantil como un órgano quiescente. Sin embargo, las células de Sertoli no entran en quiescencia durante la infancia, habiéndose demostrado que constituyen la población celular a estudiar cuando se desea valorar la existencia de tejido gonadal o la función testicular global en ese período de la vida <sup>(1)</sup>. En efecto, el hipogonadismo establecido en la infancia puede pasar desapercibido si no se estudia la función sertoliana, y recién descubrirse debido a alteraciones en el desarrollo puberal. La importancia del diagnóstico temprano del hipogonadismo ha sido puesta de relevancia por varios autores con el fin de evitar daños irreversibles en la función gonadal <sup>(2-4)</sup>. Sin embargo, dichos estudios se basan esencialmente en la evaluación de la función de las células de Leydig que requieren el uso de pruebas de estimulación con hCG o en la valoración de las células germinales en biopsias de testículo. Dada la escasa disponibilidad –hasta recientemente– de marcadores más adecuados para estudiar de modo menos invasivo la función gonadal en la infancia (marcadores sertolianos, como la AMH y la inhibina B séricas), son pocos los estudios que han evaluado la frecuencia de hipogonadismo en cuadros frecuentes que involucran al testículo en edad pediátrica.

En los últimos 20 años, el tratamiento de neoplasias malignas con quimioterapia ha mejorado sensiblemente el pronóstico de pacientes hemato-oncológicos diagnosticados en edad pediátrica. Como consecuencia del aumento significativo en la supervivencia, han comenzado a hacerse manifiestos los efectos de la quimioterapia sobre la función gonadal en pacientes que llegan a la edad puberal y adulta. Las alteraciones de la capacidad fértil son particularmente evidentes en pacientes pediátricos que recibieron quimioterapia por enfermedad de Hodgkin o leucemias <sup>(5-7)</sup>. El hipogonadismo primario específico de células germinales puede ser severo –a veces irreversible– según el esquema de tratamiento utilizado <sup>(8-10)</sup>. Todos los protocolos utilizados hasta el presente producen un deterioro de la capacidad fértil, siendo la procarbazona y la ciclofosfamida las drogas con acción gonadotóxica mejor demostrada <sup>(8, 12)</sup>. La afectación de la población de células de Leydig suele ser menor <sup>(8, 13, 14)</sup>.

Trabajos experimentales con técnicas de reciente desarrollo en roedores, muestran la posibilidad de preservar células germinales antes del tratamiento con quimioterápicos y re trasplantarlas luego en el momento deseado, con recuperación de la espermatogénesis <sup>(15, 16)</sup>. Sin embargo, es necesario que la quimioterapia no haya producido un hipogonadismo que afecte la función de las células de Sertoli, para que las mismas puedan sustentar el desarrollo espermatogénico luego del trasplante. No existen hasta el momento trabajos que hayan estudiado específicamente si la función de las células de Sertoli sufre algún deterioro durante el tratamiento quimioterápico en niños o adolescentes.

## **Objetivos**

Nos propusimos evaluar la función de las células de Sertoli a través del dosaje de AMH, en niños y adolescentes con patología hemato-oncológica antes, durante y luego del tratamiento quimioterápico. Secundariamente, también valoramos la función de las células de Leydig y las gonadotrofinas.

Nuestros objetivos específicos fueron:

- 1) determinar la incidencia de hipogonadismo que afecta la función de las células de Sertoli en varones pre púberes y en varones con desarrollo puberal con diagnóstico de neoplasia extra gonadal tratados con diferentes agentes quimioterápicos;
- 2) determinar si la afectación es reversible o irreversible;
- 3) determinar la incidencia de afectación de las células de Leydig y del eje hipotálamo-gonadotropo, evaluando también si la misma es reversible o irreversible según la etapa del desarrollo en que se haya instituido el tratamiento oncológico.

## **Material y métodos**

Se realizó un estudio prospectivo de seguimiento de una cohorte. Se clasificaron los pacientes según su diagnóstico, su exposición (protocolo de radioterapia y/o quimioterapia utilizados) y según su edad al recibir el tratamiento (prepuberales y puberales).

El desenlace primario se evaluó en cada grupo de exposición en términos de prevalencia de hipogonadismo que afecte las células de Sertoli. Como desenlaces secundarios, se analizaron la prevalencia de hipogonadismo que afecte la función de las células de Leydig y/o del eje gonadotropo.

## **Pacientes y métodos**

**Criterios de inclusión:** varones prepúberes o en pubertad con diagnóstico de enfermedad hematológica maligna extragonadal (leucemia linfoblástica aguda (LLA) o Linfoma linfoblástico (LL) )que hayan ingresado para tratamiento a la Unidad de Hematología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Se incluyeron sólo aquellos pacientes que dieron su asentimiento y cuyos padres o tutores dieron su consentimiento escrito para ser incluidos.

**Criterios de exclusión:** se excluyeron a los pacientes que habían recibido tratamiento quimioterápico previo y/ o Trasplante de Células Progenitoras hematopoyéticas (TCPH) y los pacientes con antecedente de cirugía genital u otras cirugías abdomino-pelvianas que pudieran haber afectado el pedículo vascular gonadal. Se excluyeron además: los pacientes que recibieron radioterapia que pueda afectar la función hipotálamo-hipofisaria (radioterapia craneal o corporal total) o gonadal (radioterapia abdominal o pelviana) y los pacientes con antecedentes conocidos de afecciones gonadales.

**Variables a estudiar:** Se midieron niveles hormonales: AMH, testosterona, FSH y LH, y se evaluaron las características del desarrollo: volumen testicular, genital y del vello según Marshall y Tanner <sup>(17)</sup> <sup>(8)</sup>. Todas las variables se midieron al diagnóstico de la

enfermedad (laboratorio basal), previamente al inicio cada fase o bloque de tratamiento con quimioterapia endovenosa, cada 3 meses durante la etapa de mantenimiento quimioterápico vía oral, al finalizar el tratamiento y a los 3 y 6 meses de finalizado el mismo, en las visitas de rutina de control de estos pacientes. Los niveles circulantes de AMH se determinaron por ELISA <sup>(18, 19)</sup>. Los niveles de testosterona se determinaron por RIA y los niveles de FSH y LH, por ECLIA <sup>(18)</sup>.

### **Cálculo del tamaño muestral**

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó en base a la medida de resultado primaria, o sea la proporción de hipogonadismo que afecta las células de Sertoli intratratamiento y a los 36 meses, usando como piloto un estudio retrospectivo de nuestro grupo <sup>(20)</sup>. Para poner en evidencia una prevalencia de hipogonadismo que afecta las células de Sertoli de 30%, con una precisión del 10%, un nivel de confianza del 95% y un poder del 80% es necesario incorporar 81 pacientes. Estimando una pérdida en el seguimiento a los 3 años del 20%, es necesario incluir 95 pacientes. En el siguiente informe se detalla los resultados parciales del protocolo que aún está en curso.

### **Expresión de resultados**

Los resultados de los valores hormonales en cada grupo (pre-tratamiento, intratratamiento y luego de finalizado el mismo) se expresaron como mediana y rango.

Se consideró hipogonadismo que afecte a las células de Sertoli cuando la AMH sérica se encontraba por debajo del nivel de referencia para la edad (<Pc 3), en comparación con los que hemos descrito recientemente <sup>(18)</sup>. Para la afectación del eje hipotálamo-gonadotropo usamos respectivamente los niveles de testosterona y de gonadotrofinas, que comparamos con datos recientemente publicados <sup>(18)</sup>. Para cada grupo, se estimó la proporción de pacientes con niveles anormales de cada hormona.

### **Resultados**

Se expone a continuación los resultados preliminares del proyecto en curso.

En los últimos 3 años ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez 72 varones de los cuales fueron incluidos en el protocolo 51 pacientes y se excluyeron 22 niños por los siguientes motivos (Tabla 1):

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	
	N
Síndrome de Down	2
Tratamiento previo	8
2do tumor	4
Agenesia de Cuerpo Calloso	1
Cirugía abdominal previa	1
Se deriva a otro centro para completar tratamiento	2
No firmó consentimiento	4

**Tabla 1.** Pacientes excluidos del protocolo y sus causas.

De los 51 pacientes incluidos hasta el momento del análisis 39 pacientes presentaron Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), 2 Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y 10 Linfomas no Hodgkin (LNH): 1 Linfoma de Burkitt y 9 LL. Con una mediana de edad 6.4 años (0.4-17.5) y mediana de seguimiento 1.11 años (0.0-3.04) respectivamente.

Decidimos excluir en este análisis a aquellos pacientes que tuvieran menos de 3 muestras de laboratorio realizadas (n: 9; 3 LL y 6 LLA). Obtuvimos entonces 42 varones de los cuales decidimos no incluir en este análisis preliminar a los pacientes con diagnóstico de LMA (n: 2) y Linfoma de Burkitt (n: 1) por no haber recibido tratamiento quimioterápico comparable al grupo mayoritario (LLA y LL) y ser la n de pacientes al momento demasiado pequeña para poder arribar a conclusiones. Se obtuvo así un grupo total de 39 varones con una mediana de edad de 6.91 años (0.44- 17.53) y una mediana de seguimiento de 1.03 años (0.23- 3.04).

Por otra parte subdividimos a nuestros pacientes según el desarrollo puberal al diagnóstico. Obtuvimos así 30 varones prepuberales y 9 varones puberales. (Tabla 2 y 3).

	Prepuberales	Puberales
n	30	9
Mediana de Edad (años)	4,5	13,5
Rango	0,4- 14,3	11,7- 17,5
Mediana de seguimiento (años)	1,2	2,1
Rango	0,1- 3,0	0,2- 2,5

**Tabla 2.** Edad y tiempo de seguimiento de los pacientes según desarrollo puberal.

		Prepuberales n (%)	Puberales n (%)
<b>TOTAL</b>		<b>30 (100)</b>	<b>9 (100)</b>
<b>LLA</b>	<b>TOTAL</b>	<b>26 (86.7)</b>	<b>7 (77.8)</b>
Fenotipo	B común	19 (63.3)	3 (33.3)
	Pro B	2 (6.7)	0
	Pre B	3 (10)	2 (22.2)
	T	2 (6.7)	2 (22.2)
Riesgo	Riesgo Estándar	4 (13.3)	0
	Riesgo Intermedio	14 (46.7)	4 (44.4)
	Alto Riesgo	9 (30)	3 (33.3)
<b>LL</b>	<b>TOTAL</b>	<b>4 (13.3)</b>	<b>2 (22.2)</b>
	Linfoblástico B	1 (3.33)	1 (11.1)
	Linfoblástico T	3 (10)	1 (11.1)

**Tabla 3.** Diagnóstico, estratificación por riesgo e inmunofenotipo de los pacientes según el desarrollo puberal.

### **Hormona Antimulleriana (AMH)**

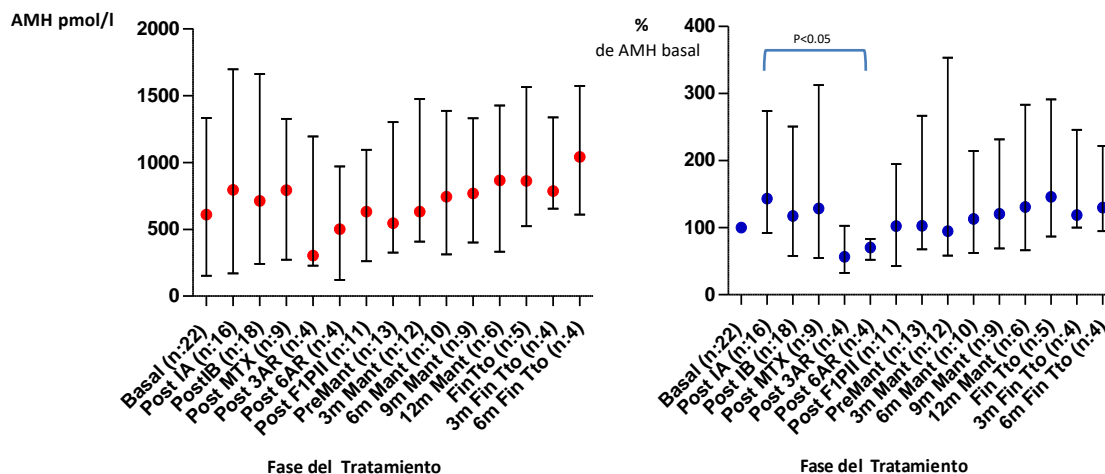
Como objetivo primario de nuestro trabajo evaluamos la prevalencia de hipogonadismo que afecte a la célula de Sertoli mediante el dosaje de AMH sérico. Se evaluó tanto el valor absoluto de AMH así como también el descenso de la misma respecto del valor basal con el que cada paciente comienza el tratamiento. Por otro lado determinamos el porcentaje de pacientes que presentaron un descenso de más del 30% respecto del laboratorio basal.

#### ***Varones Prepuberales:***

En este grupo los niveles de AMH en las distintas etapas no presentaron un descenso considerable a lo largo del tratamiento. Alcanzaron una vez finalizado el tratamiento niveles de AMH similares o superiores a los iniciales. (Figura 1).

Las concentraciones de AMH también se mantienen estables a lo largo del tratamiento si las relacionamos con la concentración de AMH basal (Figura 2), excepto un pequeño grupo de pacientes con LLA de alto riesgo que presenta un descenso importante en la evaluación post 3er y 6to bloque de poliquimioterapia a altas dosis (Post 3AR y Post 6AR respectivamente) para luego recuperar valores pre tratamiento.

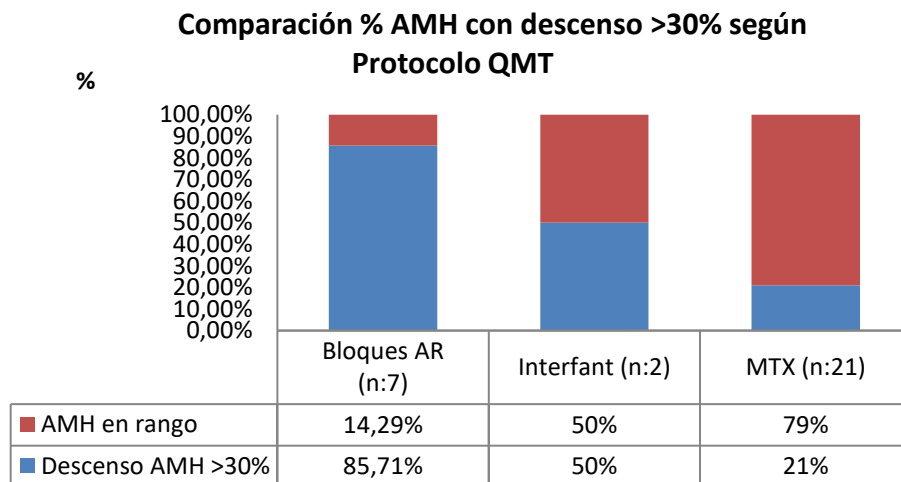




**Figura 1.** Niveles de AMH (pmol/L) en las distintas etapas del tratamiento quimioterápico en pacientes varones prepuberales expresados en mediana y rango. (Kruskall Wallis Test. Dunn's Multiple Comparison Test: ns).

**Figura 2.** Niveles de AMH expresados en porcentaje (mediana y rango) respecto al valor basal al inicio del tratamiento hemato-oncológico en varones prepuberales. (Kruskall Wallis Test. P: 0.001).

El 43.3% de los pacientes (13/30) presentan en algún momento del tratamiento un descenso de los niveles de AMH mayor al 30% del basal. Cabe destacar que 6 de los 7 pacientes (85.71%) con LLA de alto riesgo (AR) presentaron niveles hormonales con un descenso mayor al 30% respecto al nivel basal luego de realizar bloques de poliquimioterapia a altas dosis (GATLA ALLIC 2010), en comparación con 7 de los 23 (30.43%) pacientes post bloque de Metotrexato (GATLA ALLIC 2010/ LNHL GALTA 2010) o bloque OCTATAD (INTERFANT 06) (Figura 3).



**Figura 3.** Comparación de pacientes con AMH (pmol/L) descenso de AMH mayor al 30% del basal y pacientes que permanecen con valores entre 70 y 130% del basal, según protocolo de tratamiento. Chi square 0.0145.

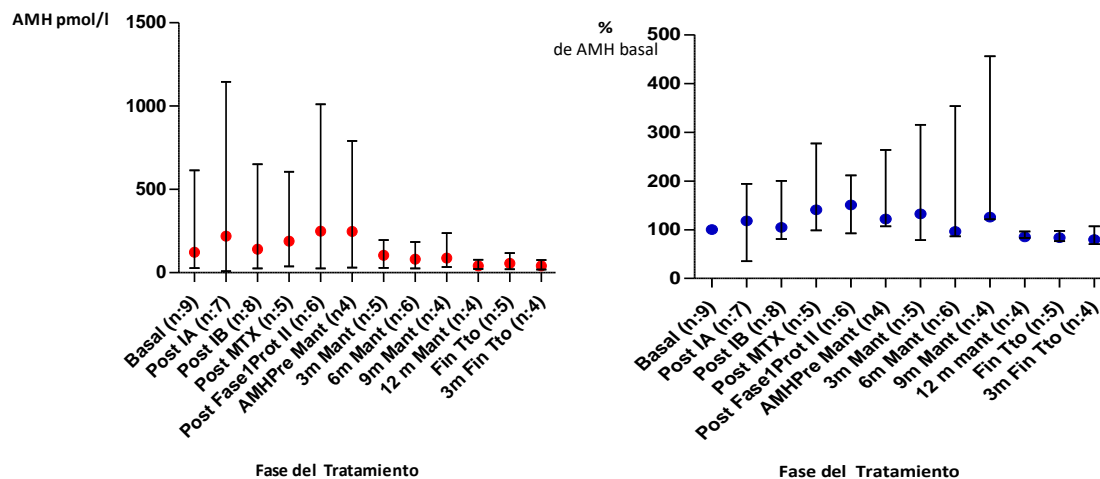
Solamente 6 pacientes (20%) del total de los varones prepuberales mostraron un descenso que alcanzara valores totales de AMH menores al Pc3 (hipogonadismo) para la edad y recuperando todos ellos valores hormonales normales una vez finalizado el tratamiento quimioterápico. 5 de ellos pertenecen al grupo de alto riesgo. El número de pacientes analizados en este subgrupo es muy reducido para poder arribar a conclusiones estadísticamente significativas. Es necesario continuar con el análisis a fin de poder evaluar estas diferencias.

### Varones Puberales:

Los pacientes puberales (n: 9) no tuvieron variaciones importantes en los niveles de AMH a lo largo del tratamiento quimioterápico (Figura 4) ni un descenso significativo con respecto a su concentración basal (Figura 5). Sin embargo el número de pacientes evaluados es muy pequeño para poder arribar a conclusiones estadísticamente significativas.

Cabe destacar que 2 de los 9 pacientes puberales (22.22%) presentaron al debut de su enfermedad hemato-oncológica valores de AMH por debajo de lo esperable para su desarrollo puberal, permaneciendo ambos con valores menores al Pc 3 para la edad y estadio de Tanner hasta los 3 meses de finalizado el tratamiento. Debido a que ambos pacientes no presentan laboratorios posteriores a este dosaje no podemos aun evaluar si se observará recuperación de la función de las células de Sertoli.

Por otra parte, 1 paciente (11.11%) presentó descenso de los niveles de AMH mayor al 30% del basal en algún momento del estudio. Sin embargo el valor absoluto de dicha AMH permaneció dentro de los valores de referencia.



**Figura 4.** Niveles de AMH (pmol/L) en las distintas etapas del tratamiento quimioterápico en pacientes varones puberales expresados en mediana y rango. (Kruskall Wallis Test. P: 0.64).

**Figura 5.** Niveles de AMH expresados en porcentaje (mediana y rango) respecto al valor basal al inicio del tratamiento hematoológico en varones puberales. (Kruskall Wallis Test. Dunn's Multiple Comparison Test: ns).

### Gonadotrofinas (LH y FSH)

#### Varones Prepuberales:

13 pacientes (43.3%) presentaron aumento de alguna de las gonadotropinas (> Pc97) durante el tratamiento quimioterápico: 6 pacientes (20%) presentaron aumento tanto de FSH como de LH, 3 pacientes (20%) aumento aislado de LH y 4 pacientes (13.3%) niveles elevados de FSH (>Pc97). (Tabla 4).

5 niños (16.7%) presentaron hipogonadismo con disminución de AMH a valores menores al Pc3 asociado a descenso de alguna o ambas gonadotropinas.

Ningún paciente presentó persistencia de valores de gonadotropinas mayores al Pc 97 a los 6 meses de finalizado el tratamiento hemato-oncológico.

	Basal	Post 1A	Post 1B	Post MTX	Post 3AR	Post 6AR	Post FLP/II	Pre Mant	3 m Mant	6m Mant	9m Mant	12m Mant	Fin trat	3m fin tto	6m fin tto
<b>N</b>	30	20	25	18	6	6	16	21	18	16	13	12	8	6	5
<b>FSH U/L</b>															
<b>Med</b>	0,61	0,28	0,87	0,58	0,60	0,79	0,67	1,27	0,73	0,85	0,73	0,97	1,16	0,82	0,50
<b>Rango</b>	0,2-2,1	0,1-2,7	0,3-3,2	0,4-3,7	0,3-2,2	0,3-2,0	0,2-1,4	0,4-4,4	0,2-3,4	0,3-2,4	0,3-2,2	0,4-2,8	0,7-3,5	0,6-2,3	0,2-0,9
<b>&gt;97 Pc (n%)</b>	1 (3,3)	3 (15,8)	3 (12,0)	4 (22,2)	2 (33,3)	0	1 (6,3)	6 (28,6)	2 (11,1)	2 (12,5)	2 (15,4)	2 (16,7)	1 (12,5)	1 (16,7)	0
<b>LH U/L</b>															
<b>Med</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<b>Rango</b>	0	0,1-0,2	0,1-0,8	0,1-3,6	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,2	0,1-2,6	0,1-1,4	0,1-1,0	0,1-0,9	0,1-2,4	0,1-1,5	0,1-0,7	0,1-0,2
<b>&gt;97 Pc (n%)</b>	1 (3,3)	0	2 (8,0)	2 (11,1)	0	0	0	2 (9,5)	1 (5,6)	1 (6,3)	0	4 (33,3)	1 (12,5)	1 (16,7)	0

**Tabla 4.** Valores de FSH y LH (U/l) en Varones Prepuberales expresados en mediana, rango y porcentaje de pacientes con valores mayores al Pc 97 para el estadio puberal.

#### **Varones Puberales:**

8 pacientes (88.9%) presentaron aumento de FSH y/o LH: 6 (66.7%) de ambas, 1 (11.1%) aumento aislado de FSH y 1 (11.1%) de LH aislado, en algún momento del seguimiento (Tabla 5); sin embargo sólo 2 (22.2%) pacientes de los 9 incluidos en este grupo presentaron hipogonadismo con descenso de AMH por debajo del Pc3 para la edad.

En el caso de los pacientes puberales podemos ver, a diferencia de los pacientes prepuberales, que el compromiso hipotálamo-hipofisario persiste a lo largo del tratamiento, persistiendo con valores mayores al Pc 97 a los 3 meses de finalizado el tratamiento en 3 pacientes (33.3%) de los pacientes de este grupo.

	Basal	Post 1A	Post 1B	Post MTX	Post FiPII	Pre Mant	3 m Mant	6m Mant	9m Mant	12m Mant	Fin Tto	3m fin tto
n	9	7	8	5	6	7	5	6	5	4	5	4
FSH U/L												
Med	2,7	4,5	6,7	7,7	11,6	10,3	9,9	14,1	8,3	8,9	10,2	9,6
Rango	0,6- 8,8	0,2- 6,5	0,4- 11,8	2,5- 24,5	1,3- 33,5	2,2- 25,1	3,9- 18,5	4,2- 20,5	4,1- 6,6	3,1- 16,5	1,7- 14	2,1- 13,3
> Pc 97 (n%)	0	1 (14,3)	5 (62,5)	4 (80,0)	5 (83,3)	6 (85,7)	4 (80,0)	5 (83,3)	4 (80,0)	3 (75,0)	4 (80,0)	3 (75,0)
LH U/L												
Med	3,7	5,1	5,4	5,8	6,5	6,1	5,2	6,2	6,7	7,5	5,3	9,0
Rango	1,5- 8,2	0,1- 8,4	0,1- 7,3	1,6- 13,9	1,- 14,4	1,7- 11,4	2,9- 8,1	4,5- 11,8	3,4- 11,8	4,8- 8,5	2,8- 11,4	3,9- 17,2
> Pc 97 n%	3 (33,3)	3 (42,9)	3 (37,5)	2 (40,0)	4 (66,7)	4 (57,1)	2 (40,0)	3 (50,0)	2 (50,0)	3 (75,0)	2 (40,0)	3 (75,0)

**Tabla 5.** Valores de FSH y LH (U/l) en Varones Puberales expresados en mediana, rango y porcentaje de pacientes con valores mayores al Pc 97 para el estadio puberal.

## Testosterona

### *Varones Puberales:*

Los valores de testosterona se analizaron sólo en varones puberales ya que los niños atraviesan un período de hipoandrogenismo fisiológico en la infancia y con los ensayos actualmente disponibles sus valores normales de testosterona incluyen el límite de detección del ensayo.

Un 33,3% (n: 3) de los pacientes puberales presentaron valores de testosterona sérica menores al Pc 3 para su estadio de Tanner (tabla 6). Llamativamente, a diferencia de lo ocurrido con los niveles de gonadotrofinas las cuales disminuyeron promediando el tratamiento y persistieron por encima de los valores normales una vez finalizado el mismo en un tercio de los pacientes, la testosterona se vio afectada al diagnóstico de la enfermedad y en las primeras etapas del tratamiento quimioterápico, normalizando los valores a partir del mantenimiento en todos los pacientes de este grupo.

Sn embargo, como ya hemos expresado previamente, el número de pacientes varones puberales incluidos hasta el momento es aún muy pequeño para poder arribar a conclusiones estadísticamente significativas.

	Basal	Post 1A	Post 1B	Post MTX	Post F1PIII	Pre Mant	3 m Mant	6m Mant	9m Mant	12m Mant	Fin Tto	3m fin tto
<b>N</b>	9	7	8	5	6	7	5	6	5	4	5	4
<b>Med</b>	133	63	608	485	708	632	636	650	523	658	625	508
<b>Rango</b>	10- 490	10- 637	10- 996	108- 821	10- 954	70- 982	504- 1120	444- 1166	448- 1185	632- 749	591- 787	491-724
<b>&lt; Pc 3 (n %)</b>	3 (33,3)	3 (42,9)	1 (12,5)	0	1 (16,7)	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 6.** Valores de Testosterona (ng/dl) en Varones Puberales expresados en mediana, rango y porcentaje de pacientes con valores menores al Pc 3 para el estadio de Tanner.

## Conclusión

En los últimos 20 años, el tratamiento de neoplasias malignas con quimioterapia ha mejorado sensiblemente el pronóstico de pacientes hemato-oncológicos diagnosticados en edad pediátrica. Como consecuencia del aumento significativo en la sobrevida, han comenzado a hacerse manifiestos los efectos de la quimioterapia sobre la función gonadal en pacientes que llegan a la edad puberal y adulta.

No existen hasta el momento trabajos que hayan estudiado específicamente si la función de las células de Sertoli sufre algún deterioro durante el tratamiento quimioterápico en niños o adolescentes.

En este análisis preliminar del protocolo prospectivo que se está llevando a cabo en el Hospital Ricardo Gutiérrez pudimos observar que en el grupo de varones prepuberales la mediana de AMH no mostró un descenso significativo durante o luego de finalizado el tratamiento en comparación con los niveles de AMH basal. Sin embargo, se pudo observar en un pequeño número de pacientes un descenso mayor al 30% del valor basal de AMH. Llamativamente, la mayoría de estos pacientes pertenecen al grupo de LLA de alto riesgo. Todos los pacientes presentaron una recuperación de dichos niveles una vez finalizado el tratamiento.

Respecto a las gonadotropinas, en este grupo pudimos observar que a lo largo del tratamiento 43.3% de los pacientes presentaron variaciones de los niveles de estas hormonas. Todos ellos normalizaron los dosajes al promediar el fin de tratamiento quimioterápico.

Los pacientes puberales no tuvieron variaciones importantes en los niveles de AMH a lo largo del tratamiento quimioterápico. Por otra parte, un 88.9% de ellos presentaron aumento de alguna de las gonadotropinas persistiendo con aumento de las mismas hasta 3 meses luego de finalizado el mismo. Es imperioso continuar el seguimiento de estos pacientes para poder evaluar si normalizarán en un futuro los niveles de FSH y LH o persistirán aumentados.

Notoriamente, en los pacientes puberales, la testosterona se vio afectada al diagnóstico de la enfermedad en un 30 a 40% de los pacientes y en las primeras etapas del tratamiento quimioterápico. A diferencia de lo ocurrido con las gonadotrofinas, la testosterona se normalizó a partir del mantenimiento en todos los pacientes de este grupo.

Como conclusión, este trabajo sugiere que la función de las células de Sertoli se encuentra preservada al menos en pacientes con LLA de riesgo estándar e intermedio y se afectaría transitoriamente en pacientes con LLA de alto riesgo. Estos resultados abren el camino a técnicas, al momento experimentales, de preservación de células germinales antes del tratamiento con quimioterápicos y trasplante luego en el momento deseado, para recuperar la espermatogénesis<sup>(15, 16)</sup>. Los resultados indicarían también la necesidad de identificar en el futuro qué factores, tanto de la enfermedad como del tratamiento podrían hacer que los pacientes con leucemia de alto riesgo sean más susceptibles a los daños en las células de Sertoli y evaluar si este subgrupo específico requiere otras técnicas de preservación de la fertilidad o si modificaciones en el tratamiento podrían ser beneficiosas.

Es preciso continuar con el estudio a fin de poder arribar a un número de pacientes suficiente que permita obtener conclusiones definitivas.

### Referencias

1. **Grinson RP, Rey RA.** Anti-müllerian hormone and Sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Horm Res Paediatr* 73: 81-92, 2010.
2. **Heiskanen P, Billig H, Toppari J y col.** Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res* 40: 351-356, 1996.
3. **Hadziselimovic F, Herzog B.** Importance of early postnatal germ cell maturation for fertility of cryptorchid males. *Horm Res* 55: 6-10, 2001.
4. **Main KM, Schmidt IM, Toppari J y col.** Early postnatal treatment of hypogonadotropic hypogonadism with recombinant human FSH and LH. *Eur J Endocrinol* 146: 75-79, 2002.
5. **Kreuser ED, Hetzel WD, Billia DO y col.** Gonadal toxicity following cancer therapy in adults: significance, diagnosis, prevention and treatment. *Cancer Treat Rev* 17: 169-175, 1990.
6. **Barton C, Waxman J.** Effects of chemotherapy on fertility. *Blood Rev* 4: 187-195, 1990.
7. **Shahin MS, Puscheck E.** Reproductive sequelae of cancer treatment. *Obstet Gynecol Clin North Am* 25: 423-433, 1998.
8. **Gerres L, Bramswig JH, Schlegel W y col.** The effects of etoposide on testicular function in boys treated for Hodgkin's disease. *Cancer* 83: 2217-2222, 1998.

9. **Blumenfeld Z, Haim N.** Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Ann Med* 29: 199-206, 1997.
10. **Fossa SD, Theodorsen L, Norman N y col.** Recovery of impaired pretreatment spermatogenesis in testicular cancer. *Fertil Steril* 54: 493-496, 1990.
11. **Schellong G.** Treatment of children and adolescents with Hodgkin's disease: the experience of the German-Austrian Paediatric Study Group. *Baillieres Clin Haematol* 9: 619-634, 1996.
12. **Kulkarni SS, Sastry PS, Saikia TK y col.** Gonadal function following ABVD therapy for Hodgkin's disease. *Am J Clin Oncol* 20: 354-357, 1997.
13. **Pasqualini T, Chemes H, Domené H y col.** Evaluation of testicular function following long-term treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 5: 11-20, 1983.
14. **Kaupila M, Viikari J, Irjala K y col.** The hypothalamus-pituitary-gonad axis and testicular function in male patients after treatment for haematological malignancies. *J Intern Med* 244: 411-416, 1998.
15. **Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL.** Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells [see comments]. *Nat Med* 2: 693-696, 1996.
16. **Nagano M, Brinster RL.** Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS* 106: 47-55, 1998.
17. **Marshall WA, Tanner JM.** Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45: 13-23, 1970.
18. **Grinspon RP, Bedecarrás P, Ballerini MG y col.** Early onset of primary hypogonadism revealed by serum anti-Müllerian hormone determination during infancy and childhood in trisomy 21. *Int J Androl* 34: e487-e498, 2011.
19. **Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P y col.** Time Course of the Serum Gonadotropin Surge, Inhibins, and Anti-Mullerian Hormone in Normal Newborn Males during the First Month of Life. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4092-4098, 2006.
20. **Grinspon, R.P.; Morales Bazurto, M.; Ballerini, M.G.y col.** Functional assessment of testicular Sertoli cell function in chemotherapy-treated prepubertal and pubertal male survivors of childhood cancer. *Horm Res Paediatr* 74 (suppl. 3): 193, 2010. (abstract)

## **Abstract**

**Introduction:** Sertoli cell is the active cell population before puberty and its function is essential for adult spermatogenesis.

**Objective:** To evaluate Sertoli cell function in boys who receive chemotherapy for ALL and LL before, during and after chemotherapy. Secondary, evaluate Leydig cell function and gonadotrophin levels.

**Materials and Methods:** A prospective study including male patients with ALL or LL. Main and secondary outcome measure were serum AMH, FSH, LH and testosterone levels before starting treatment and after each phase of chemotherapy protocol.

**Results:** 39 boys were included: 33 had ALL and 6 LL. Median and range age at diagnosis was 6.91 yr (0.4-17, 5). Median AMH, LH, FSH and Testosterone levels did not considerably decrease during chemotherapy. Few patients have a transitory decrease of AMH.

**Conclusion:** These preliminary results showed that Sertoli cell function is not affected by chemotherapy in prepubertal boys with standard or medium risk ALL, but is at least transiently affected in those with high risk LLA.



# CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES EN EL GEN DEL TRANSDUCTOR DE LA SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN (STAT)-3 HALLADAS EN NIÑOS CON RETRASO DEL CRECIMIENTO. IMPLICANCIA EN LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

Laura Ramírez, Paula Scaglia, María Gabriela Ballerini, Lucía Martucci, Liliana Karabatas, Horacio Domené, Héctor Jasper, Gutiérrez Mariana

Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE),  
CONICET – FEI – División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo  
Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina

## INTRODUCCIÓN

El retraso del crecimiento es uno de los motivos de consulta más frecuentes en los consultorios endocrinológicos. La hormona de crecimiento (GH) es un regulador endócrino clave del crecimiento post-natal, que ejerce sus acciones somatotrópicas principalmente a través del factor de crecimiento insulino-símil de tipo I (IGF-I). La acción de la GH es mediada a través de la activación de proteínas intracelulares entre las que se encuentran las proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (STAT), de tipo 1, 3 y 5 [1]. Una cascada de señalización GHR-STAT5b intacta es esencial para la expresión de IGF-I [2] y por lo tanto, para el crecimiento lineal. Sin embargo, existe escasa información sobre la relevancia de STAT3 en la regulación de la señalización intracelular del eje GH/IGF-I. Mutaciones inactivantes en *STAT3* conllevan a la forma autosómica-dominante del Síndrome de Hiper-IgE, enfermedad de disfunción multiorgánica con un fenotipo complejo que incluye inmunodeficiencia primaria asociada a niveles séricos de IgE elevados y susceptibilidad a infecciones [3]. Por otro lado, mutaciones germinales activantes en *STAT3* se hallaron recientemente en pacientes con múltiples características de autoinmunidad de inicio temprano asociadas a endocrinopatías y también, a talla baja [4,5]. Hasta la fecha, no se han realizado estudios *in vitro* que describan el impacto de estas mutaciones activantes sobre el eje GHR/IGF-I. La secuenciación del exoma completo permitió a nuestro grupo de trabajo estudiar 2 pacientes con retraso del crecimiento severo e inmunofenotipo complejo, en los cuales se identificaron 2 nuevas mutaciones en *STAT3*: una delección del ácido glutámico de la posición 616 (p.E616del) y una sustitución de la cisteína de la posición 426 por una arginina (p.C426R), compatibles con mutaciones activantes debido al fenotipo clínico de los pacientes portadores. La caracterización funcional de estas mutaciones bajo el estímulo de la GH ofrece una oportunidad única para entender el mecanismo de acción de STAT3 en la transmisión de la señal de la GH. Esto es de fundamental importancia, ya que uno de los pacientes estudiados (portador de la mutación STAT3 p.E616Del) es capaz de revertir su retraso del crecimiento bajo tratamiento con dosis farmacológicas de rhGH, sugiriendo una acción directa de la variante de STAT3 sobre la expresión de IGF-I en este paciente. En consecuencia, el objetivo principal del presente proyecto consistió en estudiar *in vitro* mutaciones presumiblemente activantes en el gen *STAT3* encontradas en pacientes con alteración del crecimiento y evaluar su impacto sobre la cascada de señalización GH/ IGF-I.

## METODOLOGÍA

1) *Obtención y caracterización de las mutantes del gen STAT3*: Se introdujeron las mutaciones deseadas en un plásmido de expresión comercial que contiene el cDNA de la STAT3 nativa humana mediante mutagénesis dirigida. Los plásmidos se transfectaron transientemente en células HEK293T incubadas en medio DMEM suplementado con piruvato y suero fetal bovino (10%) bajo condiciones controladas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Pasadas 18 horas de la transfección (70% de confluencia celular) las células se estimularon con rhGH (200 ng/mL) o IL-6 (50 ng/mL, control positivo) a distintos tiempos y posteriormente se obtuvieron los lisados celulares. Se analizaron los niveles proteicos y la capacidad de activación de las distintas variantes de STAT3 en comparación con STAT3-WT mediante Western Immunoblot utilizando anticuerpos específicos.

2) *Efecto del tratamiento con GH sobre la localización subcelular de las variantes de STAT3*: Se sembraron células HEK293-T de la forma descrita anteriormente. Luego de 24h, las células se lavaron y se depletaron de suero por 6h, previamente al tratamiento con 200 ng/mL de rhGH durante 120 minutos. Posteriormente, las células fueron fijadas con metanol:acético 3:1 durante 30 minutos y se realizó la tinción inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-(fosfo)pSTAT3. La cuantificación de núcleos positivos para pSTAT3 y el número total de células se realizó manualmente utilizando el software Fiji.

3) *Efecto de las variantes de STAT3 sobre la vía GHR/IGFs*: La actividad transcripcional de STAT3 en respuesta a la GH se evaluó mediante ensayos de gen reportero co-transfectando un plásmido que contiene un gen con elementos de respuesta a STAT3 en el promotor (luciferasa de luciérnaga) junto con un control interno (luciferasa de *renilla*) seguidos de la medición de la actividad luciferasa. Se evaluaron los niveles de transcripto *SOCS3* (Proteína Supresora de la Señalización por Citoquinas de tipo 3) por PCR cuantitativa en tiempo real en lisados celulares pre- y post-estimulación con GH.

## RESULTADOS

**Las variantes de STAT3 p.E616del y p.C426R son variantes constitutivamente activadas que incrementan su actividad en respuesta a la GH.**

En primer lugar, caracterizamos funcionalmente a las variantes de interés. Evaluamos la actividad de WT-STAT3 y las variantes en nuestro sistema a través de un ensayo de gen reportero. Observamos que la expresión *in vitro* de las variantes p.E616del y p.C426R resultó en un incremento significativo de la actividad transcripcional de las variantes ( $P < 0.05$ ) en comparación con WT-STAT3 bajo condiciones basales y en respuesta a la GH, sugiriendo que **estas mutaciones son activantes**. Sin embargo, las variantes de STAT3 no se encontraron constitutivamente fosforiladas y se expresaron con niveles similares a WT-STAT3. Ambas presentaron distintos patrones de desfosforilación: p.C426R presentó una desfosforilación retrasada sólo bajo el tratamiento con GH y p.E616del, sólo bajo el estímulo con IL-6. En concordancia con esto, en los estudios de inmunohistoquímica (IHC) sólo se observó un incremento de pSTAT3 nuclear luego de 2h de tratamiento con GH en aquellas células transfectadas con la variante p.C426R en comparación con WT-STAT3.

### **La función de STAT5b es parcialmente dañada en presencia de las variantes activantes de STAT3.**

Debido a que los pacientes portadores de las variantes de STAT3 p.C426R y p.E616del poseen retraso del crecimiento, se decidió evaluar el impacto de estas variantes sobre la actividad de STAT5b, principal mediador intracelular de la GH. Células HEK293-T fueron co-transfectadas con WT-STAT3 o variantes y STAT5b en proporciones equimolares. La actividad de STAT5b se evaluó mediante un ensayo de gen reportero. Detectamos que la actividad transcripcional de STAT5b disminuyó en presencia de las variantes activantes de STAT3, tanto en condiciones basales como bajo el estímulo de la GH ( $p < 0.05$ ). Asimismo, los niveles de ARNm de *SOCS3* -uno de los principales genes blanco de STAT3 y regulador negativo de STAT5b- se encontraron inducidos en presencia de las variantes ( $p < 0.05$ ), aunque sólo p.E616del mostró un aumento de 1.5 veces ( $p < 0.01$ ) bajo el tratamiento con GH.

## **DISCUSIÓN**

En este estudio, caracterizamos funcionalmente dos mutaciones en *STAT3* halladas en dos pacientes con retraso del crecimiento severo asociado a disregulación inmune. Ambas variantes fueron clasificadas como de ganancia de función o activantes, ya que provocan la activación de STAT3 aún en ausencia de estímulo. Esta activación basal no se debe a una fosforilación constitutiva de las variantes, ya que no se detectó fosforilación de STAT3 en condiciones no-estimuladas. Ambas variantes se fosforilaron en respuesta a los estímulos con IL-6 y GH. Sin embargo, cada mutante respondió diferencialmente a los tratamientos *in vitro*. La variante p.C426R presentó una desfosforilación retrasada en presencia del tratamiento con GH, resultados en línea con los obtenidos por IHC. Por el contrario, p.E616del presentó una fosforilación retrasada sólo en presencia de la IL-6. Los retrasos en las desfosforilaciones no fueron observados una vez que los estímulos fueron removidos del medio, sugiriendo que ambas variantes son accesibles a las fosfatasas que reciclan las proteínas STAT de vuelta al citoplasma. Por lo tanto, las mutaciones no afectarían los sitios de reconocimiento por las fosfatasas.

Por otro lado, exploramos cómo estas variantes afectan STAT5b en la vía de señalización de la GH, con el objeto de elucidar los mecanismos por los cuales los pacientes portadores de estas variantes presentan retraso del crecimiento severo. La actividad de STAT5b se encontró disminuida en presencia de las mutantes de STAT3, tanto en condiciones basales como estimuladas. Encontramos que los niveles de *SOCS3* estaban incrementados en presencia de las variantes de STAT3 bajo condiciones basales, pero sólo p.E616del mostró un aumento significativo en respuesta al tratamiento con GH. Este resultado es consistente con los patrones de desfosforilación mencionados anteriormente para esta variante. Los altos niveles de *SOCS3* para p.E616del en respuesta a la GH, podría llevar a una disminución en la fosforilación de STAT3 vía JAK2, como detectamos por Western blot. Sin embargo, p.C426R presentó niveles similares de *SOCS3* bajo condiciones basales y estimuladas con GH, en la misma línea que los resultados de la fosforilación retrasada detectada bajo el tratamiento con GH.

En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad incrementada de las variantes de STAT3 llevan a una disminución de la función de STAT5b por mecanismos ligeramente diferentes, llevando a insensibilidad parcial a la GH. Sin embargo, ambas variantes respondieron al estímulo con alta dosis de GH, lo cual permite sugerir una respuesta favorable al tratamiento con GH recombinante humana de los pacientes portadores de estas mutaciones. Estudios adicionales son necesarios para elucidar los mecanismos

subyacentes a la activación diferencial de ambas variantes, que podrían involucrar una mayor afinidad de estas por el ADN. Como el efecto de estas mutaciones de STAT3 es difícil de predecir, nuestros resultados enfatizan la importancia de acompañar los resultados genéticos con ensayos funcionales, para un mejor entendimiento de potenciales tratamientos terapéuticos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Brooks AJ, Waters MJ: The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:515–525.
- 2 Walenkamp MJE, et al: Molecular IGF-1 and IGF-1 receptor defects: from genetics to clinical management. *Endocr Dev* 2013;24:128–137.
- 3 Mogensen TH: STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties. *JAK-STAT* 2013;2:e23435.
- 4 Milner JD, Vogel TP, et al.: Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* 2015;125:591–599.
- 5 Flanagan SE, Haapaniemi E, et al.: Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet* 2014;46:812–814.

## **ABSTRACT**

Germinal heterozygous activating STAT3 mutations represent a novel monogenic defect associated with multi-organ autoimmune disease and severe growth retardation. By using whole-exome sequencing, we identified two novel STAT3 mutations, p.E616del and p.C426R, in two unrelated pediatric patients with IGF-I deficiency and immune dysregulation. The functional analyses showed that both variants were gain-of-function (GOF), although they were not constitutively phosphorylated. They presented differences in their dephosphorylation kinetics and transcriptional activities under interleukin-6 (IL-6) stimulation. Both variants increased their transcriptional activities in response to growth hormone (GH) treatment. Nonetheless, STAT5b transcriptional activity was diminished in the presence of STAT3 GOF variants, suggesting a disruptive role of STAT3 GOF variants in the GH signaling pathway. This study explores the underlying molecular pathway responsible for STAT3 activating mutations, suggesting that different mutations may drive increased activity by slightly different mechanisms.

# BÚSQUEDA DE POTENCIALES FÁRMACOS ANTITUMORALES: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS OBTENIDOS DE PLANTAS NATIVAS DE ARGENTINA

Dra. Mariana Belén Joray

Universidad Católica de Córdoba, IRNASUS-CONICET

## RESUMEN

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Proyecciones realizadas hacia el año 2030, estiman 26 millones de nuevos casos de cáncer y 17 millones de muertes por año a causa de esta enfermedad<sup>1</sup>.

Si bien el creciente conocimiento de los mecanismos que operan en el desarrollo del fenotipo tumoral ha motivado la identificación de innumerables productos utilizados en la quimioterapia del cáncer, muchos de estos agentes no han presentado el éxito esperado, aún con los considerables costos de su desarrollo<sup>2</sup>. En este sentido, es importante destacar que la mayor parte de las quimioterapias vigentes en la clínica están particularmente dirigidas a una característica de la célula tumoral, como lo es su alta tasa de replicación<sup>3</sup>. Este enfoque terapéutico no contempla que los tumores comprenden además de las células malignas, a una variedad de células y componentes no celulares que interactúan formando una intrincada red capaz de promover o inhibir la progresión del tumor<sup>4</sup>. Entre las diversas células no tumorales que forman parte de este ambiente, se encuentran las células endoteliales. Éstas son capaces de dar lugar al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente mediante un proceso que en el contexto neoplásico se denomina angiogénesis tumoral<sup>5,6</sup>.

Mientras que la angiogénesis fisiológica es regulada por un estricto balance entre numerosos factores promotores e inhibidores de la misma, el fenotipo pro-angiogénico que se dispara durante el desarrollo neoplásico promueve una continua neovascularización que permite el crecimiento sostenido del tumor y la posterior metástasis del mismo<sup>7,8</sup>. La angiogénesis tumoral es por lo tanto considerada un *hallmark* del cáncer<sup>8</sup> y en los últimos años se han publicado una gran cantidad de trabajos científicos describiendo su importancia como blanco terapéutico para el diseño y desarrollo de agentes antitumorales<sup>5,6,9-12</sup>.

No obstante, si bien mucho se ha avanzado en este campo, actualmente la terapia antiangiogénica ha sido caracterizada como *exitosa con desafíos*. Entre los principales obstáculos a superar se encuentran: su eficacia limitada, (con recurrencias agresivas ante la interrupción del tratamiento), efectos adversos severos (sangrado, hipertensión, leucopenia y linfopenia entre otros) y desarrollo de resistencia<sup>5</sup>. Adicionalmente, existe cierto escepticismo en lo que respecta a su potencial terapéutico, principalmente porque se ha visto asociada a un incremento de la hipoxia (vinculada a una mayor invasividad local y actividad metastásica en ciertos tumores) y a una disminución de la eficacia de la radioterapia y del arribo de drogas quimioterápicas al tumor<sup>11</sup>.

Sin embargo, en contraste con las limitaciones mencionadas, también existe una gran cantidad de información que sustenta el éxito de este tipo de terapia, como lo son la inhibición del crecimiento local del tumor y de la metástasis<sup>12-15</sup> y el sinergismo observado en combinaciones duales y trimodales con quimioterapia y/o radioterapia<sup>16-18</sup>. De hecho, la terapia antiangiogénica es actualmente considerada la cuarta modalidad en el tratamiento del cáncer luego de la cirugía y de la quimio- y radioterapia<sup>11</sup>.

El hecho de que actualmente existan 322 estudios clínicos en angiogénesis ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); criterio de búsqueda: angiogénesis patológica, estudios con intervención), evidencia el gran interés vigente en lo que respecta a la investigación y desarrollo de este tipo de fármacos.

En este contexto nació este proyecto, con el objetivo general de recurrir a nuestra flora nativa en busca de productos naturales (extractos vegetales y compuestos derivados de éstos) capaces de interferir negativamente con la angiogénesis. Es importante destacar que la gran diversidad estructural que ofrecen los extractos vegetales sumado al hecho de que menos del 20% de las plantas existentes en el planeta hayan sido investigadas con profundidad<sup>19</sup> constituye un fuerte incentivo para la búsqueda de principios activos en especies vegetales de nuestra región.

Para cumplir el objetivo propuesto, el efecto de extractos etanólicos obtenidos a partir de plantas de nuestra flora fue evaluado sobre la capacidad de células endoteliales de formar estructuras tubulares similares a capilares sanguíneos tras ser cultivadas sobre una base de matrigel en presencia del estímulo mediado por la quimioquina VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). Cabe mencionar que este experimento, conocido como ensayo de tubulogénesis, es considerado una de las pruebas más específicas para medir angiogénesis *in vitro*<sup>20-22</sup> dado que permite valorar de manera simultánea etapas clave del proceso de neovascularización tales como la adhesión, migración y actividad de proteasa de las células endoteliales.

Para llevar a cabo los ensayos, dos líneas celulares endoteliales fueron incorporadas: HMEC-1 (Células Endoteliales Microvasculares Humanas) y BAEC (Células Endoteliales de Aorta Bovina). Las mismas fueron generosamente donadas por el Dr. Caffé del Instituto Leloir. En nuestras condiciones de trabajo, las células BAEC respondieron mejor a los estímulos angiogénicos. Por esto, las mismas fueron seleccionadas para dar comienzo al screening mientras que las células HMEC-1 serán empleadas en futuros ensayos de validación de los resultados.

Durante el screening se logró evaluar exitosamente el efecto de 81 extractos vegetales a una dosis inicial de 100 ug/mL. Debido al gran volumen de muestras a estudiar, los experimentos fueron llevados a cabo en 4 etapas en cada una de las cuales se ensayaron alrededor de 20 extractos con sus respectivos controles. En cada instancia, una vez finalizado el experimento se realizó una valoración visual de los diferentes tratamientos y se tomaron las correspondientes imágenes. Las imágenes obtenidas fueron luego analizadas utilizando el macro “angiogénesis analyzer” del software ImageJ. Esto permitió la cuantificación de los diferentes componentes de la red tubular entre los que se destaca el número total de polígonos, número de segmentos y largo total de los segmentos. Si bien cada uno de los mencionados parámetros puede ser contemplado a los fines de evaluar cuantitativamente el ensayo, se llegó a la conclusión de que el largo total de los túbulos resultó ser el parámetro que mejor reflejó los resultados obtenidos y que mayor concordancia presentó con las diferencias observadas entre los diferentes tratamientos durante la valoración visual.

Los extractos que mostraron efecto inhibidor de la tubulogénesis en las diferentes etapas fueron inmediatamente sometidos al estudio de su efecto tóxico sobre las células BAEC a los fines de descartar que el fenómeno observado se debiera a la citotoxicidad de los mismos. Esto fue realizado mediante la técnica de MTT<sup>23</sup>. A la dosis estudiada, sólo los extractos de *Acalypha communis*, *Dalea elegans* y *Kageneckia lanceolata* ejercieron una acción tóxica del 72%, 91% y 35% respectivamente. En futuros estudios, estos extractos serán ensayados nuevamente a la máxima concentración que ejerza una toxicidad inferior al 20%. Para el caso de los extractos de *Acalypha communis* y *Kageneckia lanceolata* se pudo determinar que esta dosis es de 50 ug/mL, mientras que para *Dalea elegans* es de 12.5 ug/mL. Para todos aquellos extractos que en las diferentes etapas presentaron un efecto inhibidor en ausencia de efecto tóxico, se calcularon los porcentajes de inhibición (%I) correspondientes, los cuales fueron estadísticamente comparados con el %I de Suramina de Sodio 30 uM, empleada como control positivo de inhibición (%I = 100 %).

Los extractos con mayor efecto inhibidor fueron los obtenidos a partir de *Aloysia citriodora*, *Aloysia gratissima*, *Argemone subfusiformis*, *Bidens pilosa*, *Dolichandra unguis-cati*, *Handroanthus*

*impetiginosus*, *Pyrostegia venusta*, *Tagetes minuta*, *Thalictrum decipiens* y *Zanthoxylum coco*. Los mencionados extractos no presentaron diferencias significativas respecto a los tratamientos con Suramina sódica 30 uM ( $p > 0.05$ ). Cabe mencionar que en coincidencia con los resultados obtenidos, la actividad antiangiogénica de *Bidens pilosa* y *Aloysia citriodora* ya ha sido previamente reportada<sup>24,25</sup>.

Entre los diez extractos antiangiogénicos más potentes mencionados arriba, y teniendo en cuenta aspectos tales como la disponibilidad del material vegetal, ausencia de información previa respecto a la bioactividad en estudio, como así también respecto a la composición química de los mismos, el extracto de *Tagetes minuta* fue seleccionado para ser sometido en primer lugar al aislamiento bioguiado de sus principios activos antiangiogénicos.

Inicialmente 5g de extracto vegetal etanólico fueron sometidos a una cromatografía líquida en vacío (VLC) utilizando un gradiente de solventes hexano-éter etílico-metanol. Se recogieron 16 eluatos que fueron agrupados según su perfil químico en cromatografía en placa delgada en 4 fracciones: F1, F2, F3 y F4. Las mismas fueron ensayadas en el experimento de tubulogénesis a una concentración final de 100 ug/mL. Sólo la fracción F4 (masa total disponible, 2 g) mostró actividad. La misma fue reprocesada mediante una cromatografía en columna de Sephadex LH20. Para ello, se sembraron 500 mg de muestra disuelta en la fase móvil a emplear (hexano:cloroformo:metanol 2:1:1). Los eluatos fueron recogidos en 36 tubos de ensayo y luego agrupados según el perfil químico en TLC en 6 fracciones, F4.1 a F4.6. De las mismas, la fracción F4.5 mostró efecto antiangiogénico en los ensayos de actividad y fue sometida a una cromatografía en columna de sephadex LH20 adicional (FM: hexano:éter etílico:metanol 2:1:1). De este proceso resultaron cinco fracciones adicionales designadas F4.5.1 a F4.5.5. El perfil químico en TLC corrida con hexano:acetato de etilo 80:20 mostró que las fracciones F4.5.2, F4.5.3 y F4.5.4 contenían un spot mayoritario compatible con un principio activo con un alto grado de pureza. Los mismos fueron provisoriamente designados como TGM-1, TGM-2 y TGM-3, respectivamente. En los ensayos de bioactividad sólo TGM-2 y TGM-3 mostraron capacidad de inhibir en proceso de tubulogénesis a una concentración de 10 ug/mL. Con la finalidad de obtener mayor cantidad de principio activo para así poder disponer de suficiente masa para los estudios de NMR y poder elucidar las correspondientes estructuras, el procedimiento detallado fue repetido tres veces más hasta procesar el total de F12-16 (fracción madre) disponible. Por un lado, se obtuvieron 3.4 mg de TGM-2. La pureza del mismo fue determinada por HPLC, empleando una fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O 70:30. Se pudo observar que el pico correspondiente a TGM-2 representaba el 80% de la muestra. La misma fue entonces sometida a estudios de NMR en una y dos dimensiones (1H, 13C, HSQC, HMBC y COSY). El análisis de los mismos permitió determinar que TGM-2 es una molécula que pertenece a la familia de los tiofenos. Más exactamente es un bitiofeno denominado 5-(4-hidroxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno. Por otro lado cuando la muestra de TGM-3 fue analizada por HPLC, se vio que su pureza era inferior al 70% por lo que debía ser reprocesada a los fines de aumentar este porcentaje. Un total de 14 mg de muestra (TGM-3) fueron sometidos a una cromatografía flash empleando un cartucho de fase reversa. La fase móvil utilizada fue escogida de acuerdo a la información obtenida en las corridas de HPLC. La misma fue una mezcla ACN:H<sub>2</sub>O 50:50. De este procedimiento se obtuvieron 2 mg de TGM-3 con una pureza >90%. El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear permitió determinar que TGM-3 es el tertiofeno denominado alfa-tertienilmetanol.

Si bien la presencia de ambos compuestos ha sido descripta con anterioridad en el género *Tagetes*, nada se conoce respecto a la actividad antiangiogénica de los mismos. Ésto, sumado a la ausencia de efecto tóxico, hace que estos compuestos ameriten ser estudiados con mayor profundidad en sus mecanismos de acción para así poder posicionarse como potenciales candidatos a ser empleados en la terapia antiangiogénica.

Finalmente, es importante señalar que la ejecución de este proyecto ha permitido obtener información sin precedentes en lo que respecta a la actividad moduladora de la angiogénesis de especies de plantas mayormente nativas de nuestro país. Esto, además de impactar positivamente en



lo que respecta a la terapia antiangiogénica también representa una gran contribución al avance científico en materia de bioprospección colaborando en forma sustancial con el conocimiento y aprovechamiento que podemos dar a nuestros recursos naturales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Thun, M. J., DeLancey, J. O., Center, M. M., Jemal, A. & Ward, E. M. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* **31**, 100–110 (2010).
2. Solowey, E. *et al.* Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *ScientificWorldJournal* **2014**, 721402–12 (2014).
3. Ivey, J. W., Bonakdar, M., Kanitkar, A., Davalos, R. V. & Verbridge, S. S. Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment. *Cancer Letters* **380**, 330–339 (2016).
4. Bhome, R. *et al.* Translational aspects in targeting the stromal tumour microenvironment: From bench to bedside. *New Horizons in Translational Medicine* (2016). doi:10.1016/j.nhtm.2016.03.001
5. Gacche, R. N. & Meshram, R. J. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1846**, 161–179 (2014).
6. Gacche, R. N. & Meshram, R. J. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **113**, 333–354 (2013).
7. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
9. Wang, Z. *et al.* *Semin. Cancer Biol.*
10. Weis, S. M. & Cheresh, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* **17**, 1359–1370 (2011).
11. Abdollahi, A. & Folkman, J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* **13**, 16–28 (2010).
12. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 273–286 (2007).
13. Abdollahi, A., Hlatky, L. & Huber, P. E. Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist. Updat.* **8**, 59–74 (2005).
14. Kerbel, R. & Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2**, 727–739 (2002).
15. Broxterman, H. J. & Georgopapadakou, N. H. Anticancer therapeutics: a surge of new developments increasingly target tumor and stroma. in **10**, 182–193 (Elsevier, 2007).
16. Huber, P. E. *et al.* Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. *Cancer Res.* **65**, 3643–3655 (2005).
17. Jain, R. K. Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 309–316 (2008).
18. Duda, D. G., Jain, R. K. & Willett, C. G. Antiangiogenics: the potential role of integrating this novel treatment modality with chemoradiation for solid cancers. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4033–4042 (2007).
19. Wink, M. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. (Wiley-Blackwell, 1999).
20. Madri, J. A., Pratt, B. M. & Tucker, A. M. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **106**, 1375–1384 (1988).
21. Grant, D. S. *et al.* Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. *J. Cell. Physiol.* **153**, 614–625 (1992).
22. Arnaoutova, I. & Kleinman, H. K. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc* **5**, 628–635 (2010).

23. Joray, M. B. *et al.* P53 tumor suppressor is required for efficient execution of the death program following treatment with a cytotoxic limonoid obtained from *Melia azedarach*. *Food Chem. Toxicol.* (2017). doi:10.1016/j.fct.2017.04.039
24. Wu, L.-W. *et al.* A novel polyacetylene significantly inhibits angiogenesis and promotes apoptosis in human endothelial cells through activation of the CDK inhibitors and caspase-7. *Planta Med.* **73**, 655–661 (2007).
25. Zihlif, M. *et al.* Screening the antiangiogenic activity of medicinal plants grown and sold in Jordan. *Planta Med.* **78**, 297–301 (2012).

## ABSTRACT

Despite the efforts made in the development of chemotherapeutic agents, most of these have not presented the expected success. This is associated in part with the fact that most therapies do not contemplate the complexity of the tumor microenvironment where an intricate network of cellular and non-cellular components is capable of promoting or inhibiting tumor progression. Such is the case of endothelial cells, capable of originating new blood vessels, necessary for the sustained growth and the subsequent metastasis of the tumor. This tumor angiogenesis is recognized as a prominent target for the design and development of antitumor agents. Current antiangiogenic therapy presents numerous challenges related to its limited efficacy, adverse effects and resistance which demands the investigation and development of new agents that lack the mentioned limitations.

The executed project arose in response to the mentioned problem with the objective of going to our native flora in search of natural products capable of interfering negatively with angiogenesis.

The antiangiogenic effect of 81 plant derived extracts was evaluated. The extracts with the greatest effect were those obtained from *Aloysia citriodora*, *Aloysia gratissima*, *Argemone subfusiformis*, *Bidens pilosa*, *Dolichandra unguis-cati*, *Handroanthus impetiginosus*, *Pyrostegia venusta*, *Tagetes minuta*, *Thalictrum decipiens* and *Zanthoxylum coco*. The extract of *T. minuta* was selected to be subjected to the bioguided isolation of its antiangiogenic compounds. This afforded two molecules identified as 5- (4-hydroxybut-1-ynyl) -2,2'-bithiophene and alfa-tertienylmethanol. The tertiothiophene was the most effective component. Additional studies are being carried out to elucidate the mechanism of action mediated by this compound.

The remarkable effect of the tertiothiophene, added to the total absence of toxicity on the studied cells, makes it deserves to be studied in depth to be able to position itself as a candidate to be used in antiangiogenic therapy.

# PREVALENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN *HFE* EN PACIENTES CON RASGO $\beta$ -TALASÉMICO Y EN INDIVIDUOS SALUDABLES DE LA PROVINCIA DE TUCUMÁN. ESTUDIO ANALÍTICO DE SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DEL HIERRO

Sandra Stella Lazarte, María Eugenia Mónaco, Natalia Sofía Alvarez Asensio, Cecilia Haro, Miryam Emilse Ledesma Achem, Magdalena María Terán, Blanca Alicia Issé

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

## SÍNTESIS

### INTRODUCCIÓN

La proteína HFE (*Human hemochromatosis protein*) es codificada por el gen *HFE* y participa en la regulación del metabolismo del hierro. Las publicaciones respecto a la presencia simultánea de mutaciones  $\beta$ -talasémicas y mutaciones en el gen *HFE* revelan discrepancias con respecto a la afectación del estado del hierro en estos sujetos. El objetivo del trabajo fue establecer la prevalencia de las mutaciones más frecuentes en el gen *HFE* en una población de individuos con rasgo  $\beta$ -talasémico (RBT) y en una población control, y estudiar su relación con el metabolismo del hierro.

### METODOLOGÍA

Se efectuó un estudio analítico en el Instituto de Bioquímica Aplicada, durante el período setiembre 2016-agosto 2018. Los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado. La Declaración de consentimiento informado fue aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UNT.

Se realizó hemograma, electroforesis de hemoglobina a pH alcalino, cuantificación de HbA<sub>2</sub>, hierro (Fe), capacidad total de unión de Fe a transferrina (CTUT) y ferritina. Las mutaciones en el gen *HFE* y las mutaciones  $\beta$ -talasémicas se analizaron mediante PCR tiempo real. El estudio estadístico se efectuó con el programa SPSS.

## RESULTADOS

El estudio incluyó 71 sujetos aparentemente sanos (3 niños, 47 mujeres y 21 hombres) pertenecientes a 70 familias, y 65 portadores de RBT (11 niños, 35 mujeres y 19 hombres) pertenecientes a 57 familias. La frecuencia alélica de la población completa (sujetos control + sujetos con RBT) para las mutaciones H63D, C282Y y S65C fue de 13.5% (IC95%= 9.8-18.3%), 4.4% (IC95%= 2.4-7.6%) y 0.4% (IC95%= 0.07-2.21%), respectivamente. La prevalencia en el grupo control fue 28% (20/71; IC95%= 19-40%). El 8% (6/71) presentó mutación heterocigota en codón 282 (C282Y), y 20% (14/71; 11 heterocigotos y 3 homocigotos) en codón 63 (H63D). La prevalencia en el grupo RBT fue 34% (22/65; IC95%= 24-46%). Cuatro portadores (6%) fueron heterocigotos para C282Y, 16 (25%) para H63D, 1 (1.5%) para la mutación en codón 65 y uno (1.5%) fue doble heterocigoto para H63D y C282Y. En la Tabla 1 se observan las frecuencias alélicas obtenidas en el estudio actual, en otras ciudades argentinas, en otros países sudamericanos y en países de los cuales desciende la población tucumana. Las frecuencias alélicas detectadas fueron superiores a las informadas por Soria *et al* en la región central de Argentina, pero en el caso de la mutación H63D fue semejante a la publicada en otros países sudamericanos. Como era de esperar, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre los portadores  $\beta$ -talasémicos y la población general.

**Tabla 1:** Distribución de las frecuencias alélicas de las mutaciones H63D, C282Y y S65C en Argentina, países sudamericanos y países de los que desciende la población tucumana

País	Localidad o región	Referencia	N	Frecuencia alélica [%]		
				H63D	C282Y	H65C
Argentina						
	Córdoba	Soria <i>et al</i> , 2009	421	6.7	2.6	ND
	Buenos Aires	Felipoff <i>et al</i> , 2017	99	14.6	2.0	0.5
	Tucumán	Estudio actual	136	12.5	4.0	0.4
Brasil						
	Espírito Santo	Alves <i>et al</i> , 2016	120	11.67	1.67	0.83
Chile						
	Santiago	Wolff <i>et al</i> , 2006	178	12.4		ND
			(H63D)		1.2	ND
			82 (C82Y)			
Colombia						
	Antioquía	Avila-Gomez <i>et al</i> , 2008	1120	15.49	1.83	0.09
España						
	Islas Baleares	Lopez-Escribano <i>et al</i> ,	142	20.4	0.7	ND
	Madrid	2012	1000	16.4	1.7	ND
		Ropero <i>et al</i> , 2006				
El Líbano						
	Beirut	Mahfouz <i>et al</i> , 2012	116	13.8	0.0	ND
Italia						
	Arsita	Floreani <i>et al</i> , 2007	502	15.0	1.9	ND
	Domodossola	Salvioni <i>et al</i> , 2003	606	14.9	4.7	0.74

Abreviaturas: N, número de participantes; ND, no determinado

Aproximadamente el 90% de los portadores de RBT fueron de origen italiano, español y árabe. El resto fueron criollos y de origen francés, búlgaro y alemán. La mayoría de las mutaciones fueron detectadas en individuos descendientes de italianos (Tabla 2). La mutación  $\beta$ -talasémica más frecuente fue IVSI-110 (28%, 18/65), seguida por IVSI-1 (25%, 16/65), CD39 (18%, 12/65), IVSII-745 (5%, 3/65), IVSI-6 (3%, 2/65) e IVII-1 (1.5%, 1/65).

**Tabla 2:** Relación entre el origen étnico y las mutaciones detectadas en los sujetos  $\beta$ - talasémicos heterocigotos

Origen étnico	Mutación Beta- Talasémica							TOTAL	Mutación HFE			
	CD39	IVSI-1	IVSI-110	IVSI-6	IVSII-1	IVSII-745	ND		C282Y	H63D	S65C	WT
Español	2	3	1	1	0	0	2	9	1	0	0	8
Italiano	6	0	5	0	1	2	2	16	1	6	1	8
Árabe	0	4	0	0	0	0	1	5	0	2	0	3
Español-Italiano	2	1	5	0	0	1	3	12	1	2	0	9
Español-Árabe	0	4	1	0	0	0	3	8	1	2	0	5
Italiano-Árabe	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Criollo	1	1	2	1	0	0	0	5	0	2	0	3
Árabe-Francés	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Español-Italiano-Árabe	0	0	2	0	0	0	0	2	0	1	0	1
Español-Italiano-Árabe-Alemán	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Español-Italiano-Búlgaro	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Francés	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Español-Árabe-Búlgaro	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Desconocido	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
<b>Total</b>	12	16	18	2	1	3	13	65	5	17	1	42

Fuente: Elaboración propia a partir de datos recabados en el estudio.

Abreviaturas: ND, no determinado; WT, *wild type*

El análisis del metabolismo del Fe en el grupo control no demostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) según portaran o no mutación en el gen *HFE*. El grupo RBT mostró mayores niveles de Fe y ferritina que el grupo control ( $p < 0.05$ ), y el grupo RBT con mutación H63D presentó aumento de las mismas variables con respecto a los controles con idéntica mutación ( $p < 0.05$ ). Fe y saturación estuvieron significativamente más altos en el grupo RBT con mutación H63D con respecto a RBT sin mutación ( $p < 0.05$ ). Al igual que en otros trabajos, la comparación entre los portadores  $\beta^0$  y  $\beta^+$  con o sin mutación en el gen *HFE* no detectó diferencias significativas en los parámetros relacionados al Fe, excepto CTUT que tuvo un aumento significativo en el grupo  $\beta^+$  con mutación en el gen *HFE*.

## CONCLUSIONES

Las frecuencias alélicas de las mutaciones en el gen *HFE* estarían relacionadas con el origen étnico de la población de Tucumán. No hubo cambios en el estado del hierro de los individuos saludables con mutación H63D, pero sí en los sujetos con RBT y dicha mutación. Ello indicaría que existen modificadores genéticos presentes en los individuos con  $\beta$ -talasemia que incidirían en su balance férrico. Estos resultados enfatizarían la necesidad de evaluar la presencia de mutaciones en el gen *HFE* en individuos con rasgo  $\beta$ -talasémico a fin de mejorar su calidad de vida evitando comorbilidades.

## REFERENCIAS

1. Ganz T, Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.*, 2011;62:347-60
2. Camaschella C, Pagani A. Advances in understanding iron metabolism and its crosstalk with erythropoiesis. *British J Haematol*, 2018.
3. Rund D, Rachmilewitz E.  $\beta$ -Thalassemia. *N Engl J Med*, 2005;353:1135-46.
4. Thein SL. The Molecular Basis of  $\beta$ -Thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013;3:a011700
5. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet*, 2018;391(10116):155-167.
6. Ribeil JA, Arlet JB, Dussiot M, Moura IC, Courtois G, Hermine O. Ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia. *Scientific World Journal*, 2013;2013:394295.
7. Jones E, Pasricha SR, Allen A, Evans P, Fisher CA, Wray K, Premawardhana A, Bandara D, Perera A, Webster C, Sturges P, Olivieri NF, St Pierre T, Armitage AE, Porter JB, Weatherall DJ, Drakesmith H. Heparin is suppressed by erythropoiesis in hemoglobin E  $\beta$ -thalassemia and  $\beta$ -thalassemia trait. *Blood*, 2015;125(5):873-80.
8. El Beshlawy A, Alaraby I, Abdel Kader MS, Ahmed DH, Abdelrahman HE. Study of serum heparin in hereditary hemolytic anemias. *Hemoglobin*, 2012;36(6):555-70.
9. Nemeth E. Heparin in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1202:31-5.
10. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet*, 2016;388(10045):706-16.
11. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*, 1996;13(4):399-408.
12. Barton JC, Edwards CQ, Acton RT. HFE gene: Structure, function, mutations, and associated iron abnormalities. *Gene*, 2015;574(2):179-192.
13. Hollerer I, Bachmann A, Muckenthaler MU. Pathophysiological consequences and benefits of HFE mutations: 20 years of research. *Haematologica*, 2017;102(5):809-817.

14. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem*, 2003;49(5):769-76.
15. Lazarte SS, Mónaco ME, Haro AC, Jiménez CL, Ledesma Achem ME, Issé BA. Molecular characterization and phenotypical study of  $\beta$ -thalassemia in Tucumán, Argentina. *Hemoglobin*, 2014;38(6):394-401.
16. Moysés CB, Moreira ES, Asprino PF, Guimarães GS, Alberto FL. Simultaneous detection of the C282Y, H63D and S65C mutations in the hemochromatosis gene using quenched-FRET real-time PCR. *Braz J Med Biol Res*, 2008;41(10):833-8.
17. Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, Cao A, Galanello R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in  $\beta$ -thalassemia carriers. *Haematologica*, 2002;87:242-5.
18. Martins R, Picanço I, Fonseca A, Ferreira L, Rodrigues O, Coelho M, et al. The role of HFE mutations on iron metabolism in beta-thalassemia carriers. *J Hum Genet*, 2004;49:651-5.
19. Nadkarni AH, Singh AA, Colaco S, Hariharan P, Colah RB, Ghosh K. Effect of the hemochromatosis mutations on iron overload among the indian  $\beta$  thalassemia carriers. *J Clin Lab Anal*, 2016;00: 1-5.
20. AlFadhli S, Salem M, Shome DK, Mahdi N, Nizam R. The effects of HFE polymorphisms on biochemical parameters of iron status in Arab beta-thalassemia patients. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2017;33(4):545-51.
21. Jazayeri M, Bakayev V, Adibi P, Haghghi Rad HF, Zakeri H, Kalantar E, Zali MR. Frequency of HFE gene mutations in Iranian beta thalassaemia minor patients. *Eur J Haematol*, 2003;71:408-11.
22. Mellouli F, El Borgi W, Kaabi H, Ben Hassen E, Sassi R, Hmida H, Cherif G, Maamar M, Zouari B, Boukef K, Bejaoui B, Hmida S. HFE gene mutations in Tunisian major  $\beta$ -thalassemia and iron overload. *Transfusion Clinique et Biologique*, 2006;13:353-7.
23. Estevão IF, P. Peitl Junior P, Bonini-Domingos CR. Serum ferritin and transferrin saturation levels in  $\beta^0$  and  $\beta^+$  thalassemia patients. *Genet Mol Res*, 2011;10(2):632-9.
24. López-Escribano H, Ferragut JF, Parera MM, Guix P, Castro JA, Ramon MM, Picornell A. effect of co-inheritance of  $\beta$ -thalassemia and hemochromatosis mutations on iron overload. *Hemoglobin*, 2012;36(1):85-92.
25. Enein AA, El Dessouky NA, Mohamed KS, Botros SKA, Abd El Gawad MF, Hamdy M, Dyaa N. Frequency of hereditary hemochromatosis (*HFE*) gene mutations in egyptian beta thalassemia patients and its relation to iron overload. *Macedonian J Med Scie*, 2016;4(2):226-31.
26. Soltanpour MS, Kambiz Davari K. The correlation of cardiac and hepatic hemosiderosis as measured by T2\*MRI technique with ferritin levels and hemochromatosis gene mutations in Iranian patients with beta thalassemia major. *Oman Med J*, 2018;33(1):48-54.



27. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, *et al.* Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study Research Investigators. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med*, 2005;352(17):1769-78.
28. Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arija V. Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol*, 2010;89(8):767-73.
29. Kaczorowska-Hac B, Luszczuk M, Antosiewicz J, Ziolkowski W, Adamkiewicz-Drozynska E, Mysliwiec M, *et al.* HFE gene mutations and iron status in 100 healthy polish children. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2017;39(5):e240-3.
30. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, *et al.* HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol*, 2001;114(2):474-84.
31. Worwood M. Iron deficiency anaemia and iron overload. In: Meloni D, Oberle K, Saltzberg D, editors. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 10<sup>TH</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p.131-60.
32. Soria NW, Cossy Isasi S, Chaig MR, Gerez de Burgos NM. Analysis of C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in blood donors from Córdoba, Argentina. *Ann Hematol*, 2009;88(1):77-9.
33. Alves LN, Santos EV, Stur E, Silva Conforti AM, Louro ID. Molecular epidemiology of HFE gene polymorphic variants (C282Y, H63D and S65C) in the population of Espírito Santo, Brazil. *Genet Mol Res*. 2016;15(2).
34. Wolff CF, Armas RM, Frank J, Poblete PG. [Mutations of hemochromatosis gene in volunteer blood donors and Chilean porphyria cutanea tarda patients]. *Medicina (Buenos Aires)*. 2006;66(5):421-6.
35. Avila-Gomez IC, Aristizabal-Bernal B, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Prevalence of H63D, S65C and C282Y mutations of the HFE gene in 1120 voluntary blood donors from Antioquia region of northwest Colombia. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40(3):449-51.
36. Felipoff AL, Fleischman SJ, Donadío ML, Sebastiano V, Castro M, Velicce A, Rey JA, Lardo MM, Langini SH. [Iron intake and HFE gen in male adults from Buenos Aires]. *Medicina (B Aires)*. 2017;77(6):458-64.
37. Ropero P, Briceño O, Mateo M, Polo M, Mora A, González FA, Villegas A. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in a cohort of 1,000 neonates in Madrid (Spain). *Ann Hematol*. 2006;85(5):323-6.
38. Mahfouz RA, Saredine DS, Charafeddine KM, Abdul Khalik RN, Cortas NK, Daher RT. Should we screen for hereditary hemochromatosis in healthy Lebanese: a pilot study. *Mol Biol Rep*. 2012;39(1):753-9.
39. Floreani A, Rosa Rizzotto E, Basso D, Navaglia F, Zaninotto M, Petridis I, DI Andrea O, Testa R, Marra M, Baldo V, Chiaramonte M. An open population screening study for HFE gene major mutations proves the low prevalence of C282Y mutation in Central Italy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(4):577-86.

40. Salvioni A, Mariani R, Oberkanins C, Moritz A, Mauri V, Pelucchi S, Riva A, Arosio C, Cerutti P, Piperno A. Prevalence of C282Y and E168X HFE mutations in an Italian population of Northern European ancestry. *Haematologica*. 2003;88(3):250-5.
41. Lucotte G, Dieterlen F. A European allele map of the C282Y mutation of hemochromatosis: Celtic versus Viking origin of the mutation? *Blood Cells Mol Dis*. 2003;31(2):262-7.
42. Rosatelli MC, Tuveri T, Scalas MT, Leoni GB, Sardu R, Faà V, Meloni A, Pischedda MA, Demurtas M, Monni G, et al. Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the Italian population. *Hum Genet*. 1992;89(6):585-9.
43. Rigoli L, Meo A, Miceli MR, Alessio K, Caruso RA, La Rosa MA, Salpietro DC, Ricca M, Barberi I. Molecular analysis of beta-thalassaemia patients in a high incidence area of southern Italy. *Clin Lab Haematol*. 2001;23(6):373-8.
44. Murad H, Moassas F, Ghoury I, Mukhalalaty Y. Haplotype Analysis of Three Common  $\beta$ -Thalassemia Mutations in Syrian Patients. *Hemoglobin*. 2018;42(5-6):302-305.
45. Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA. Genetic heterogeneity of Beta thalassemia in Lebanon reflects historic and recent population migration. *Ann Hum Genet*. 2005;69(Pt 1):55-66.
46. Kawabata H. The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. *Int J Hematol*. 2018;107(1):31-43.

## ABSTRACT

Human hemochromatosis protein (HFE) is encoded by *HFE* gene and participates in iron regulation. The aim was to establish the prevalence of most frequent *HFE* gene mutations in a control population and in  $\beta$ -thalassemic trait (BTT) carriers, and to study their relationship with iron metabolism. **Methodology:** An analytical study was carried out at Instituto de Bioquímica Aplicada, during September 2016-August 2018. Total blood count, hemoglobin electrophoresis at alkaline pH, HbA2 quantification, iron (Fe), total Fe binding capacity and ferritin were performed. *HFE* gene mutations were analyzed by real-time PCR. **Results:** One hundred and six individuals (71 normal and 65 BTT) belonging to 127 families were examined. The allelic frequency for H63D, C282Y and S65C mutations was 13.5% (95% CI = 9.8-18.3%), 4.4% (95% CI = 2.4-7.6%) and 0.4% (IC95% = 0.07-2.21%), respectively. The prevalence in control group was 28% (20/71, 95% CI = 19-40%). Eight percent (6/71) presented a codon 282 heterozygous mutation (C282Y), and 20% in codon 63 (H63D) (14/71, 11 heterozygotes and 3 homozygotes). BTT group prevalence was 34% (22/65, 95% CI = 24-46%). Four carriers (6%) were heterozygous for C282Y, 16 (25%) for H63D, 1 (1.5%) for codon 65 mutation and 1 (1.5%) was H63D and C282Y double heterozygous. Control group Fe metabolism did not show significant differences ( $p > 0.05$ ) according they carried or not a *HFE* gene mutation. BTT group, with and without H63D mutation, showed higher Fe and ferritin than their controls ( $p < 0.05$ ). Fe and saturation were significantly higher in BTT group with H63D mutation respect to BTT without it ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** The allelic frequencies of *HFE* gene mutations would be related to ethnic origin of Tucumán population. There were no changes in iron status of healthy individuals with H63D mutation, but BTT subjects with same mutation showed iron metabolism disturbance. Probably, there are genetic modifiers in  $\beta$ -thalassemia individuals that would affect their ferric balance.

**Key words:** HFE, beta-thalassemia, hereditary hemochromatosis, iron metabolism

# ESTUDIOS FUNCIONALES Y EPIDEMIOLOGICO DE LOS EFECTOS DEL FLÚOR Y EL ARSÉNICO SOBRE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

Neira MV, Vaquero S, Rigalli A, Lupo M

Centro Universitario de Estudios Medioambientales. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario

## Resumen

La fluorosis se caracteriza por el ingreso al organismo de flúor (F), habitualmente con el agua de bebida. Puede manifestarse con moteado dental hasta alteraciones en el sistema nervioso y endócrino. El consumo de arsénico (As) crónicamente se asocia al Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), condición grave de larga evolución que presenta lesiones en piel, alteraciones cancerosas, no cancerosas y metabólicas. El F y As están asociados individualmente al desarrollo de diabetes mellitus (DM). La DM tipo II comprende un grupo heterogéneo de trastornos que se caracteriza por déficit en la secreción, insulinoresistencia y una mayor producción de glucosa. La importancia de evaluar conjuntamente la participación del F y el As en la estimación del riesgo de DM reside en la frecuente coexistencia de ambos elementos en numerosas regiones y al efecto diabetogénico evidenciado por parte de cada uno de ellos. Diversas áreas de nuestro país, entre ellas las provincias de Santa Fe, La Pampa y Buenos Aires, presentan suelos y aguas subterráneas que muestran de modo natural concentraciones elevadas de As y F, por lo cual nos propusimos este proyecto. Donde estudiamos la población de General Pico, firmando los voluntarios un consentimiento informado, donde al caracterización general fue: residencia 5 años o más, sexo, edad, educación, estilo de vida, antecedentes familiares, características e índices antropométricos, etc. Se les solicitó una muestra de agua que utilizan para consumo como bebida o preparación de alimentos. Para la recopilación, almacenamiento y análisis de la información se desarrolló un software en el entorno de R al que se lo denominó ATLANTIS 1.0. Se entrevistó a más de 40 voluntarios, que se les midió glicemia y remitieron una muestra de agua. Aunque la elección fue al azar, el sexo femenino contribuyó mayoritariamente a la muestra analizada, con una mediana de edad de 27 años y 3 voluntarios presentaron glicemias mayores a las normales. Se correlacionó glicemia y F, y As, sin encontrar correlación significativa. El 20 % de la población presenta signos de HACRE y más del 50% signos de fluorosis dental. Esto puede deberse a que un 87.5 % de la población estudiada consume aguas con concentraciones de F superiores al límite y un 97.5 % de As. Como conclusión de este trabajo podemos decir que la población estudiada está expuesta a concentraciones de F y As mayores a las recomendadas por la OMS. Dado que la relación As/F podría estar influenciando los signos observados de forma diferencial, en el subsidio recibido por la Fundación Alberto J Roemmers para el período 2018-2020 se analizarán otras poblaciones con diferente relación As/F.

## Introducción

La fluorosis es una patología originada por el ingreso al organismo de fluoruro (F), habitualmente con el agua de bebida. Tiene manifestaciones que se extienden desde el moteado dental hasta alteraciones en el sistema nervioso y endócrino. A su vez, el consumo de arsénico (As) por largos períodos de tiempo se ha asociado a una enfermedad denominada Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), condición grave de larga evolución que se caracteriza por presentar lesiones en piel, alteraciones cancerosas, no cancerosas y metabólicas (Corey 2008). Ambos contaminantes están asociados al desarrollo de diabetes mellitus (DM) tipo I y tipo II (Navas 2006, Lupo 2010). La DM constituye un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica afectando el metabolismo proteico y lipídico. La DM tipo I presenta una destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas y conduce a un déficit de insulina. La DM tipo II comprende un grupo heterogéneo de trastornos que se caracteriza por déficit en la secreción de insulina, insulinoresistencia y una mayor producción de glucosa (ADA 2010). La contaminación del agua subterránea por As o F representa un importante problema de salud pública en diversas regiones del mundo. Si bien diferentes autores consideran que la adición de manera controlada de iones de F en el sistema de agua potable constituye una medida efectiva para reducir el riesgo de caries dental, una exposición superior a los valores recomendados por la Organización Mundial de la Salud (1.5 mg/L, OMS) se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar fluorosis dental y esquelética (Rigalli 2007). En lo que respecta al As, aunque aún no se encuentra definido un valor de dosis umbral que se considere completamente seguro, se han establecido niveles guía, según la OMS este valor corresponde a 0.01mg/L.

Si bien estudios epidemiológicos realizados en áreas con elevadas concentraciones de As en agua de bebida muestran un incremento consistente del riesgo de DM, la evidencia procedente de otras regiones resulta aún inconclusa. En este sentido, no resulta sencilla la extrapolación de tales resultados a otras regiones del mundo. En años recientes se han realizado trabajos en EEUU, región caracterizada por bajas concentraciones de As, con resultados contradictorios (Navas 2006, Navas 2008, Steinmaus 2009, Navas 2009). Como limitación a la interpretación de otros trabajos, poco se ha considerado sobre la contribución de otros contaminantes y sus posibles interacciones con el As al momento de estimar el riesgo de desarrollar DM (Navas 2006). La importancia de evaluar conjuntamente la participación del F y el As en la estimación del riesgo de DM reside en la frecuente coexistencia de ambos elementos en numerosas regiones y al efecto diabetogénico evidenciado por parte de cada uno de ellos (Navas 2006, Francisca 2009, Rosso 2011, Lupo 2010).

Diversas áreas de nuestro país, entre ellas las provincias de Santa Fe, La Pampa y Buenos Aires, presentan suelos y aguas subterráneas que muestran de modo natural concentraciones elevadas de As ( $\geq 0.05$  mg/L) y/o F ( $\geq 1.5$  mg/L) (Corey 2008, Lupo 2012). Contemplando las características de nuestra región y la incertidumbre actual sobre la asociación de los contaminantes mencionados y DM, es que nos propusimos este proyecto.

## Materiales, métodos y resultados

Se definieron las localidades de trabajo según su exposición a As y/o F. Anterior a este proyecto se realizó un relevamiento del contenido de F en todo el territorio de la provincia de Santa Fe, que incluye zonas de contenido inferior, igual y superior al límite establecido por la OMS (Lupo 2012). Posteriormente se amplió dicho relevamiento al muestreo de As y otros componentes habituales del agua de consumo, como nitrito, nitrato, sulfato, nitrógeno total, fosfato, demanda química de oxígeno, sodio, magnesio, calcio, etc. Con estos datos y utilizando Sistemas de Información Geográfica (OPS 1996) para analizar la distribución espacial de estos contaminantes y su comportamiento según variables fisicoquímicas de las muestras analizadas, se definieron las regiones según mayor o menor concentración de estos elementos, solos o combinados (Neira 2018). Las regiones identificadas son: General Pico, Cañada de Ucle, Santa Regina, Villa Cañas y Rosario. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de As y F en cada región, así como la relación entre ellas y el número de muestras analizadas:

Localidad	F, ppm (mediana)	As, ppm (mediana)	n	F/As
Santa Regina	0,7	0,0045	23	155
General Pico	1,81	0,029	60	62
Cañada de Ucle	1,05	0,082	4	12
Rosario	0,13	0,0024	14	54
Villa Cañas	1,26	0,059	3	21

En este proyecto se estudió la población de General Pico y el resto de las poblaciones se están estudiando actualmente con otro subsidio otorgado por la Fundación Alberto J Roemmers 2018-2020. Todos los voluntarios fueron invitados a participar en el proyecto, y se los informó del mismo, firmando éstos un consentimiento informado.

La caracterización general de los participantes según variables de interés fue: todos los voluntarios que residen desde hace 5 años o más en la localidad analizada fueron reclutados de forma voluntaria. Aquellos que prestaron su consentimiento fueron caracterizados según sexo, edad, educación, características sociodemográficas, estilo de vida (tabaquismo, consumo de alcohol, hábitos dietéticos y actividad física, entre otros), antecedentes familiares de enfermedades relevantes, características e índices antropométricos (peso, talla, circunferencias de la cintura y cadera, Índice de Masa Corporal - IMC - e índice cintura/cadera).

A los voluntarios se les solicitó una muestra de agua que utilizan para consumo como bebida o preparación de alimentos.

Para el diagnóstico de DM se utilizaron los criterios estandarizados de la American Diabetes Association, según los valores de glucemia en ayunas. Estos se consideran normales cuando son inferiores a 100 mg/dl, sugieren DM cuando superan 126mg/dl o Glucemia en Ayunas Alterada (GAA) si se ubican entre 100 y 125 mg/dl. El diagnóstico se confirmó con al menos una prueba adicional a realizar en un día distinto y se les facilitó la obtención de una consulta médica. Además, se tuvo en cuenta si el participante refiere antecedentes de DM o utilización de medicación específica para el tratamiento de la misma (ADA 2010). La determinación de la glucemia en ayunas se realizó utilizando un equipo con tiras reactivas.

Se recopiló información sobre factores de riesgo y otras variables que puedan actuar como factores confundidores. Entre ellos, la bibliografía refiere la edad ( $\geq 45$  años), sobrepeso ( $\text{IMC} \geq 25 \text{Kg/m}^2$ ), inactividad física, antecedentes familiares de DM, antecedentes personales de GAA o Tolerancia a la Glucosa Alterada (TGA), alteraciones lipídicas ( $\text{HDL} \leq 35 \text{mg/dl}$  y/o  $\text{TAG} \geq 250 \text{mg/dl}$ ), hipertensión arterial ( $> 140/90 \text{ mmHg}$ ), síndrome de ovario poliquístico, enfermedad vascular, diabetes gestacional o nacimiento de un niño con peso  $> 4 \text{Kg}$  y el consumo de medicación que pueda inducir hiperglucemia (diuréticos tiazídicos, betabloqueantes, corticoides, etc) (ADA 2010). A partir de los datos provenientes de la ingesta de As y F según distintas fuentes, se evaluaron índices de exposición, como el Cumulative Arsenic Exposure (Navas 2006 FAO/WHO 1989, EFSA 2005).

Para el caso del F, y en colaboración con odontólogos pertenecientes al Laboratorio de Biología Ósea, se utilizaron índices adicionales que permitan estimar su exposición individual y poblacional, entre ellos el índice de Dean, el índice de fluorosis de la comunidad e índice Thylstrup-Fejerskov (TF) (Dean 1935, Dean 1942, Thylstrup 1978). Se realizaron determinaciones de As y F en muestras de agua que consume el paciente. La concentración de F se midió por potenciometría directa (Rigalli 2007) y la medición de As se realizó por reducción con Zn y reacción de la arsina con dietilditiocarbamato de plata (Moreno 2002).

#### Desarrollo del software ATLANTIS 1.0

Dado el gran número de muestras y datos con el que se trabajó, se decidió crear un software en el lenguaje del entorno de programación de R de manera de recopilar toda la información con menor posibilidad de error. El software recibió el nombre de Atlantis 1.0 y además permite realizar análisis de los datos directamente en el software.

El software consta de un sector de manejo que permite el acceso a personas con contraseña. Incorpora un menú con diferentes acciones. Permite introducir directamente las mediciones de los instrumentos y se calculan y tabulan los resultados de las mediciones, calculando el coeficiente de variación de cada determinación y los parámetros de control de calidad de cada medición: CV%, valor de la solución control de calidad, pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación de la recta de regresión. Este software de diseño propio, permitió una administración y análisis más rápido y seguro de los datos.

La imagen siguiente muestra el diagrama de bloques del software y sus principales flujos de información

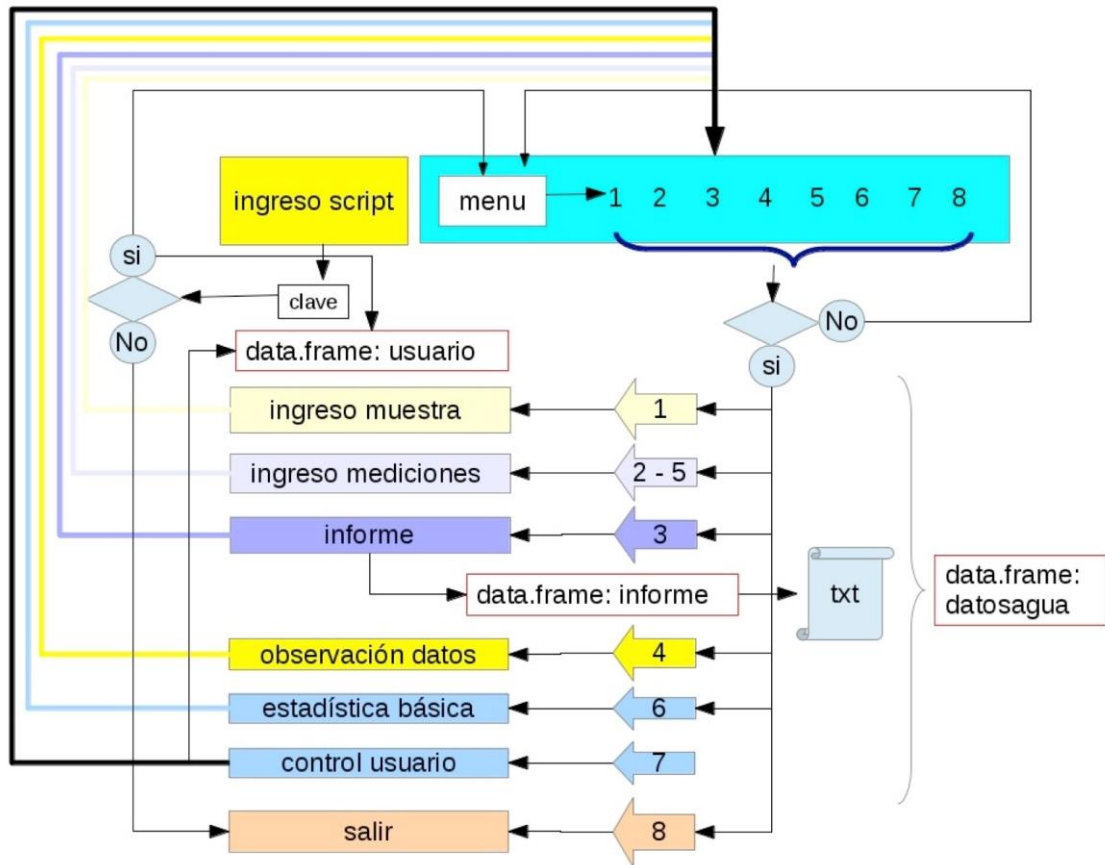


Ilustración 1: Diagrama de flujo del software ATLANTIS 1.0.

Análisis de la información obtenida del formulario y la calidad del agua consumida

Hasta el momento se cuenta con más de 40 voluntarios, que han contestado el cuestionario, se les midió la glicemia y han remitido una muestra de agua de consumo. La muestra de agua fue ingresada en la base de datos de ATLANTIS 1.0 y se analizaron los componentes habituales químicos de la misma.

Se presentan a continuación los resultados del análisis del cuestionario realizado a cada voluntario. Se analizó el origen del agua consumida, el sexo, la edad, la glicemia en ayuno y las concentraciones de arsénico y fluoruro de las muestras de agua remitidas por cada voluntario.

Gráfico de sexo voluntarios

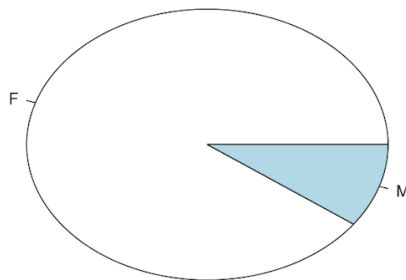


Ilustración 2: Distribución por sexo de los voluntarios. F= femenino, M= masculino.



Aunque la elección fue al azar, el sexo femenino contribuyó mayoritariamente a la muestra analizada. La ilustración 3 muestra la distribución de la edad de los voluntarios del proyecto con una mediana de 27 años.

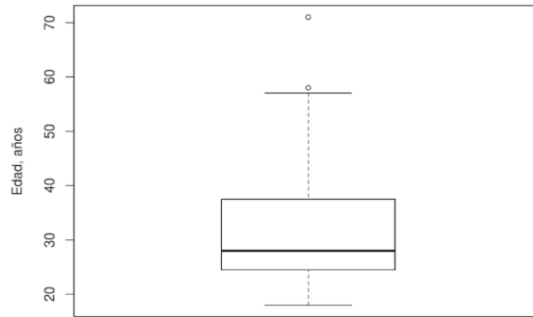


Ilustración 3: Edad de los voluntarios. La caja central representa los percentilos 25% y 75%, mientras que la línea dentro de la caja representa la mediana. El rango de los datos esta representado por las líneas punteadas y los puntos.

La ilustración 4 sintetiza los valores de las glicemias en ayuna de los 40 voluntarios, 3 presentaron glicemias mayores a las normales.

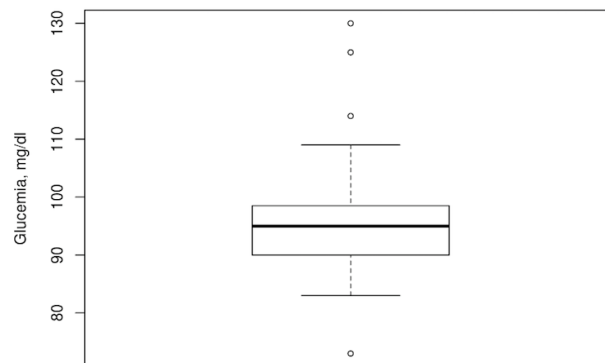


Ilustración 4: Glucemia en ayuna de los voluntarios en mg/dl. La caja central representa los percentilos 25% y 75%, mientras que la línea dentro de la caja representa la mediana. El rango de los datos esta representado por las líneas punteadas y los puntos.

Ilustración 5 observamos la concentración de arsénico y fluoruro en función de glucemia. No se halló correlación entre las variables, correlación de Pearson  $p > 0.05$ .

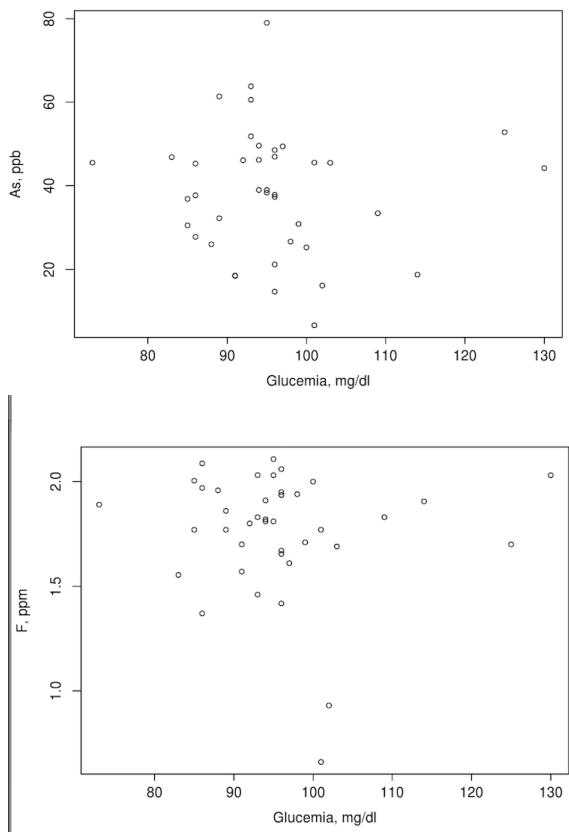


Ilustración 5: En el grafico de la izquierda se observa la concentración de arsénico (en ppb) en función de la glucemia y en el de la derecha la concentración de fluoruro (en ppm) en función de la glucemia.

También se analizó el porcentaje de voluntarios que presentaban signos de HACRE y se los clasificó de acuerdo a sus manifestaciones, como se indica a continuación:

no: cuando no presentaban ningún síntoma

l: si presentaban signos leves de hiperqueratosis palmar o plantar

m: si presentaban signos moderados de hiperqueratosis palmar o plantar

g: si presentaban signos graves de hiperqueratosis palmar o plantar

La ilustración 6 muestra que aproximadamente el 20 % de la población presenta signos de HACRE.

**Manifestaciones de HACRE**

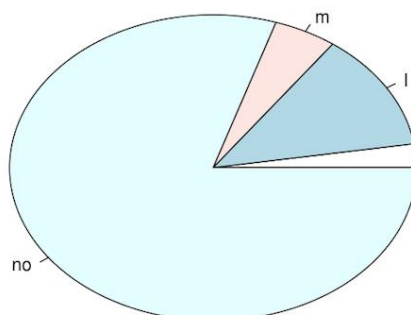


Ilustración 6: Gráfico de sectores de los porcentajes en los cuales se clasificaron las manifestaciones de HACRE en los voluntarios. Hiperqueratosis palmar o plantar leve: l, moderada: m, grave: g y sin signos: no.

El mismo análisis se realizó en relación a la fluorosis dental y se los clasificó de acuerdo a sus manifestaciones:

no: cuando no presentaban moteado dental

l: si presentaban moteado dental leve

m: si presentaban moteado dental moderado

g: si presentaban moteado dental grave

La ilustración 7 representa la proporción de individuos en cada grupo de la clasificación anterior.

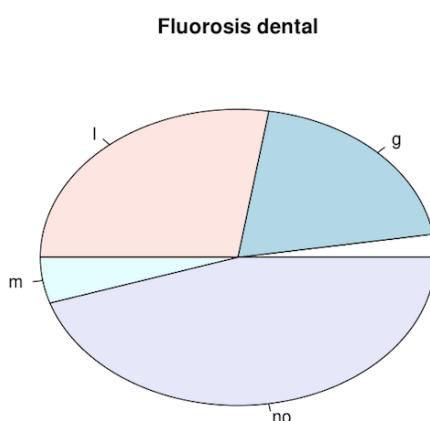


Ilustración 7: Gráfico de sectores de los porcentajes en los cuales se clasificaron las manifestaciones de fluorosis dental en los voluntarios. Moteado dental leve: l, moderada: m, grave: g y sin signos: no

Como se observa en el gráfico más del 50% de los voluntarios presentaron signos de fluorosis dental.

La ilustración 8 muestra la concentración de fluoruro en las aguas de consumo de la población, donde el 87.5 % consume aguas con concentraciones de fluoruro superiores al límite establecido por la OMS, de 1.5 ppm. Este resultado explica en gran parte las proporciones mostradas en la ilustración 6.

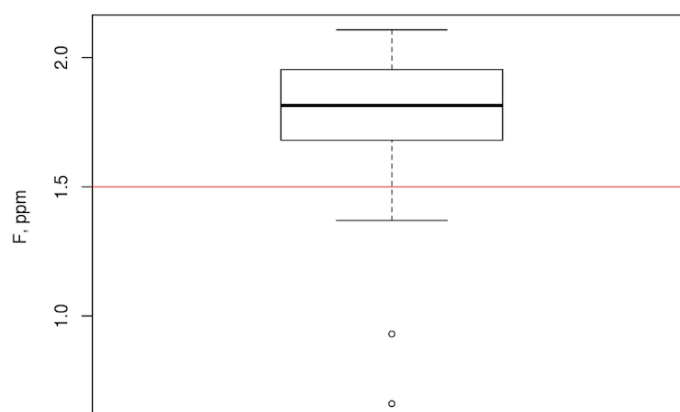


Ilustración 8: Concentración de fluoruro expresada en ppm. La caja central representa los percentilos 25% y 75%, mientras que la línea dentro de la caja representa la mediana. El rango de los datos esta representado por las líneas punteadas y los puntos. La línea roja identifica el límite máximo impuesto por la OMS

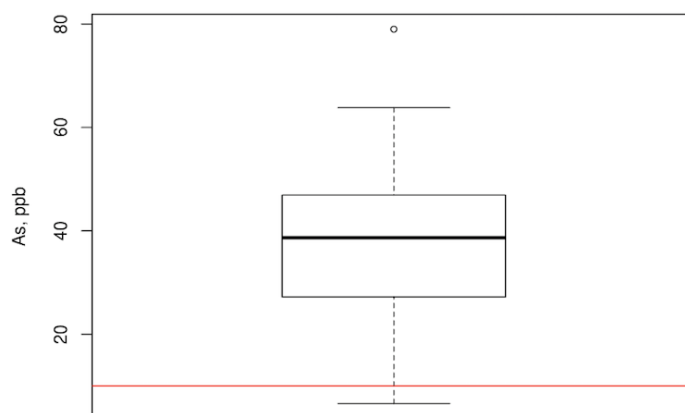


Ilustración 9: Concentración de arsénico expresada en ppb. La caja central representa los percentilos 25% y 75%, mientras que la línea dentro de la caja representa la mediana. El rango de los datos esta representado por las líneas punteadas y los puntos. La línea roja identifica el límite máximo impuesto por la OMS.

El 97.5 % de las aguas analizadas de La Pampa superan el límite de arsénico impuesto por la OMS, ilustración 9.

## Conclusión y discusión

Como conclusión de este trabajo podemos decir que la población estudiada de General Pico está expuesta a concentraciones de F y As mayor a las recomendadas por la OMS. Esto quedó evidenciado por la concentración de ambos componentes en el agua de bebida. También, cuando se evaluaron las características físicas de los voluntarios, observamos que un 50% presenta signos de fluorosis dental y un 20% signos de HACRE. Pudimos observar una relación estrecha As/F, que podría estar influenciando aún más los signos observados. Por esto es que en el subsidio ganado 2018-2020, se analizarán otras poblaciones con diferente relación As/F, para determinar si esa relación influye de forma mayoritaria sobre la manifestación de ambas patologías.

**Este proyecto continuará gracias al nuevo aporte de la fundación, para poder contar con un número mayor de voluntarios y de otras zonas geográficas.**

## Bibliografía

- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010; 33(Suppl 1):S62-S69.
- Corey G, et al. Estudio epidemiológico por exposición al arsénico a través del consumo de agua. 2° Ed. Gobierno de Santa Fe. ENRESS. 2008.
- Dean HT, et.al. (1935). Studies on the minimal threshold of the dental signs of chronic endemic dental fluorosis (mottled enamel). Public Health Reports, 50, 1719-29.

- Dean H. (1942). The investigation of physiological effects by the epidemiological method. In: Moulton, R.F. (Ed.), Fluorine and Dental Health. American Association for Advancement of Science, Washington pp. 23-31
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Fluoride. EFSA J 2005, 192, 1–65.
- FAO/WHO (1989). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 776.
- Francisca FM, et.al. (2009) Assessment of natural arsenic in groundwater in Cordoba Province, Argentina. *Environ Geochem Health*, 31:673–82.
- Lupo M, et.al. (2010) Effect of fluoridated water on plasma insulin levels and glucose homeostasis in rats with renal deficiency. *Biol Trace Elem Res*, 140(2):198-207.
- Lupo M, et. al. (2012) Determination of water fluoride concentration and the influence of the geographic coordinate system and time. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8): 5221-25.
- Navas-Acien A, et. al. (2006) Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. *Environ Health Perspect*, 114(5): 641-8.
- Navas-Acien A, et. al. (2008) Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in us adults. *JAMA*, 300(7): 814-22.
- Navas-Acien A, et. al. (2009) Arsenic exposure and Prevalence of Type 2 Diabetes: Updated Findings from the National Health Nutrition and Examination Survey, 2003-2006. *Epidemiology*, 20(6):816-2.
- Neira M, Yassogna J, Lupo M, Rigalli A. (2018) ¿El agua potable es saludable? Creencias vs realidad, Libro de resúmenes de XXVI Jornadas de jóvenes investigadores de Asociación de Universidades del Grupo Montevideo, Mendoza.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud (1996). "Uso de Sistemas de Información Geográfica en Epidemiología (SIG-Epi). En: [www.paho.org/spanish/sha/epibul\\_95-98/bs961sig.htm](http://www.paho.org/spanish/sha/epibul_95-98/bs961sig.htm).
- Moreno FP, et. al. (2002) Optimización del método de determinación de arsénico en aguas potables por espectrofotometría UV-VIS con Dietil Ditiocarbamato de Plata. *J. Mex Chem Soc*, 175-9.
- Rigalli A, et. al. (2007) Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. 1º Ed. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- Rosso JJ, et. al. (2011) Occurrence of Fluoride in Arsenic- Rich Surface Waters: A Case Study in the Pampa Plain, Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol*, 87:409–413
- Steinmaus C, et. al. (2009) Low-level population exposure to inorganic arsenic in the United States and diabetes mellitus: a reanalysis. *Epidemiology*, 20(6):807-15.
- Thylstrup A, Fejerskov O. (1978) Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol*, 6(6):315-28.

## **Abstract**

Fluorosis is generated by drinking water with fluoride (F) and is evidenced with dental mottled and alterations in the nervous and endocrine system. Arsenic (As) consumption is chronically associated with Regional Endemic Chronic Hydroarsenicism (HACRE), a serious condition of long evolution that presents skin lesions, cancerous and non-cancerous and metabolic alterations. F and As contribute to the development of diabetes mellitus (DM). Type II DM comprises a heterogeneous group of disorders characterized by deficit in secretion, insulin resistance and increased glucose production. Various areas of our country have soils and groundwater that naturally show high concentrations of As and F. We studied the population of General Pico, the general characterization was: residence 5 years or more, sex, age, education, lifestyle, family history, anthropometric characteristics and indices, etc. A software called ATLANTIS 1.0 was developed in the R software for data storage, collection and analysis. 40 volunteers were interviewed, water that consume was analyzed and glycemia were measured. Although the choice was random, female contributed mostly to the sample analyzed, with a median age of 27 years old and 3 volunteers presented glycemia greater than normal. Glycemia and F, and As were correlated, without finding significant correlation. 20% of the population show signs of HACRE and more than 50% signs of dental fluorosis. This may be due to the fact that 87.5% of the population studied consume water with concentrations of F above the limit and 97.5% of As. So we can say that the population studied is exposed to concentrations of F and As higher than recommended by WHO. Given that the As/F ratio could be influencing the signs observed differentially, in the 2018-2020 subsidy won, other populations with different As/F ratios will be analyzed.

# INCORPORACIÓN DE NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS DEL POTENCIAL ÉXITO REPRODUCTIVO DE UNA MUESTRA Y OPTIMIZACIÓN DE ABORDAJES TERAPÉUTICOS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE LA INSEMINACIÓN INTRAUTERINA EN PACIENTES INFÉRTILES

Luque Guillermina M, Baró Graf Carolina, Torres Nicolás, Puga Molina Lis del C, Romarowski Ana, La Spina Florenza A, Krapf Dario, Buffone Mariano G

Institución: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) CONICET.  
Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción

## Síntesis del informe final

Los espermatozoides de mamífero no poseen capacidad fecundante al momento de ser eyaculados. La adquieren durante el tránsito por el tracto reproductor femenino en un proceso denominado capacitación. Durante el mismo ocurren cambios bioquímicos en el espermatozoide que le permiten adquirir funciones esenciales como la hiperactivación (HA) y la capacidad de realizar la exocitosis acrosomal. La HA espermática consiste en un cambio en el patrón de movimiento resultando en uno vigoroso, de gran desplazamiento lateral de la cabeza, con incremento en la longitud y amplitud del movimiento del flagelo. Existe alta correlación entre los niveles de HA espermática y la tasa de embarazo. Es por ello que *potenciar los niveles de HA resultará de gran beneficio en las técnicas de reproducción asistida de baja complejidad*. El ingreso de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) al espermatozoide, a través del canal CatSper, es indispensable para la ocurrencia de la HA por lo que, modulando los niveles intracelulares de este catión podemos inducir la movilidad hiperactiva. En el presente proyecto nos propusimos la *inducción de la HA mediante dos procedimientos que aumentan los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$* .

El primero, se basó en la utilización de **ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$** . Según antecedentes el ionóforo permite el ingreso masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  al espermatozoide murino, el cual luego de restaurar su homeostasis resulta en una estimulación de la HA. Este procedimiento simularía el incremento masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en estadios tardíos de la capacitación, saltando numerosas etapas que en un espermatozoide patológico pudieran estar alteradas. Está recientemente descrito que la incubación transiente con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  rescató la capacidad fecundante de espermatozoides provenientes de múltiples ratones *knockout* con fenotipo infértil. *Hasta el día de la fecha, nadie ha testado este protocolo en espermatozoides humanos*, por lo que nos propusimos como primer objetivo determinar las condiciones óptimas para inducir la HA en espermatozoides humanos mediante el uso de A23187 (un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ). A partir del análisis de 15 donantes distintos mediante el sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) determinamos que 10 min de incubación con A23187 2  $\mu\text{M}$  seguidos de al menos 180 min de recuperación en medio capacitante, son necesarios para obtener valores máximos de HA en espermatozoides humanos. Habiendo establecido el protocolo óptimo, nos propusimos

como segundo objetivo evaluar la seguridad de este procedimiento en términos de daño en el ADN. Para ello, se determinó la fragmentación del ADN espermático por la prueba de TUNEL/ioduro de propidio mediante citometría de flujo en muestras de donantes sanos con fertilidad comprobada. A partir de estos experimentos concluimos que el tratamiento con A23187 no produce cambios significativos en el daño del ADN espermático.

El segundo procedimiento, propone la incubación de los espermatozoides por cortos periodos de tiempo a **temperaturas superiores a los 37°C**. En estudios preliminares, observamos que la incubación a 40°C provoca un incremento significativo en los niveles de HA en espermatozoides humanos. A diferencia del tratamiento con el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , el aumento de la HA inducido por temperatura se produce acompañado con un incremento en los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina, un evento relacionado con la capacitación. Nuestro objetivo en esta etapa fue caracterizar los mecanismos por los cuales el aumento de temperatura durante la capacitación (40°C) provoca un incremento en la HA espermática. Mediante el análisis de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares por citometría, utilizando la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 AM, observamos que los espermatozoides incubados a 40°C en condiciones capacitantes presentan mayores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  que aquellos incubados a 37°C. Esto corrobora que el aumento de temperatura provoca un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides, lo cual creemos puede ser debido a la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a la temperatura. Utilizamos entonces, un abordaje farmacológico para determinar la participación de los canales CatSper y TRPV1 en el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por temperatura. Mediante el uso de un agonista de TRPV1 (Capsaicin) a 37°C, observamos que el porcentaje de espermatozoides hiperactivados es similar al obtenido en aquellos incubados a 40°C sin agonista. Sin embargo, los espermatozoides incubados con antagonistas de TRPV1 (Capsazepine o BCTC) a 40°C, no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de HA en comparación con los incubados solamente a 40°C. Esto sugiere que TRPV1 no sería el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable del aumento en la HA inducido por temperatura. Sorprendentemente, el bloqueo del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  específico de espermatozoides CatSper (con su inhibidor farmacológico HC-056456) disminuyó significativamente el porcentaje de HA inducido por la incubación a 40°C. A partir de estos resultados, nos planteamos la hipótesis de que el aumento de temperatura induce un incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la activación del canal CatSper. Durante la capacitación los canales CatSper son activados por el incremento de pH intracelular y la hiperpolarización de membrana que ocurren durante este proceso. Asimismo, se ha descrito que, en espermatozoides humanos y no así en murinos, CatSper es activado por progesterona. Sin embargo, *no existe hasta el momento, ningún reporte de que CatSper fuese sensible a temperatura*. Mediante una medición indirecta de la actividad del canal CatSper pudimos observar que la incubación a 40°C en condiciones capacitantes provoca una mayor apertura de CatSper en comparación con aquellos espermatozoides incubados a 37°C. Este es el primer indicio de que la temperatura podría ser un activador de este canal de  $\text{Ca}^{2+}$  específico de espermatozoides.

En conjunto, todos estos resultados son relevantes ya que ambos procedimientos podrían ser utilizados para tratar ciertos casos de infertilidad masculina en combinación con técnicas de fertilización *in vitro* e inseminación intrauterina. Asimismo, profundizar los mecanismos que controlan la actividad del canal CatSper ayudará a comprender mejor



la etiología de la infertilidad de origen masculino, a desarrollar nuevas estrategias anticonceptivas, como también a mejorar la reproducción de animales de interés comercial.

## Abstract

Sperm acquire the ability to fertilize in the female genital tract in a process called capacitation. During capacitation, sperm undergo a change in the motility pattern called hyperactivation which is characterized by asymmetrical flagellar beating and it is critical to fertilization. There is a high correlation between the levels of hyperactivated sperm and the pregnancy rate. *Increasing hyperactivation levels would be of great benefit in assisted reproduction techniques of low complexity as intrauterine insemination.* The increase in intracellular calcium concentration through the sperm-specific CatSper ion channels is crucial for hyperactivation. In the present work, the induction of hyperactivation through two different procedures that increase the intracellular calcium levels was proposed. On one hand, the **transient incubation with calcium ionophore A23187** was set up in human sperm. Although human sperm were immobilized by calcium ionophore, they initiated hyperactivated motility after this reagent was washed away by centrifugation. The safety of this procedure was analyzed in terms of DNA damage, and no differences between A23187 incubation and control conditions were found. On the other hand, **incubation of human sperm in 40°C** increased intracellular calcium levels assessed by flow cytometry, which also resulted in greater percentage of hyperactivation in comparison with those incubated at 37°C. Furthermore, we used a pharmacological approach to determine the participation of TRPV1 or CatSper channels in this event. Incubation of sperm at 40°C with TRPV1 antagonist resulted in similar hyperactivated cells compared to 40°C only. Surprisingly, by using a specific inhibitor of CatSper at 40°C, a decrease in hyperactivated sperm was detected. Taken together, all these results are relevant since both procedures could be used to treat certain cases of male infertility in combination with techniques of *in vitro* fertilization and intrauterine insemination.

# DESARROLLO DE UN NUEVO MARCADOR BIOLÓGICO PARA LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO BASADO EN EL ESTUDIO DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS B

Juan Pablo Mackern Oberti

IMBECU Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo

## Introducción

Durante las últimas décadas se han reportado avances en relación a los mecanismos patogénicos de las enfermedades autoinmunes(1-8). Sin embargo, aún no se han desarrollado terapias específicas para trastornos autoinmunes sistémicos como Lupus Eritematoso Sistémico o Artritis Reumatoide(9-18). La identificación de nuevos mecanismos patogénicos autoinmunes permitirán diseñar terapias efectivas que reduzcan la respuesta autorreactiva y resguarden la competencia del sistema inmune. Por otro lado, el estudio de la variabilidad y el fenotipo individual de los pacientes con enfermedades autoinmunes mediante la utilización de nuevos marcadores biológicos para colaborar con el seguimiento de la eficiencia de nuevas terapias podrá llevar a desarrollar una medicina de precisión. La alta incidencia de enfermedades autoinmunes sobre el sexo femenino sugiere que las hormonas femeninas son un factor de riesgo considerable. Estudios en humanos indican que existe una asociación entre hiperprolactinemia y enfermedades autoinmunes sugiriendo así un rol importante de prolactina (PRL) en estos trastornos(19-39). Las acciones de PRL (40-43) están mediadas por su receptor (PRL-R) que puede tener diferentes isoformas incluyendo una isoforma larga (PRL-RL) formado por un dominio extracelular, uno transmembrana y uno transductor de señales intracelulares. La isoforma corta (PRL-RS) carece del dominio citoplasmático y por consiguiente no posee señalización intracelular. Las isoformas PRL-RS y PRL-RL se encuentran co-expresadas en diferentes tejidos incluyendo órganos linfáticos. Sin embargo heterodímeros formados por PRL-RL y PRL-RS son funcionalmente inactivos (44-53). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, durante la lactogénesis, el señalamiento del PRL-RL en glándula mamaria es diferente al presente en hígado, y que PRL-RL se encuentra regulado de manera diferencial en hígado y glándula mamaria. Además, nuestro grupo de trabajo ha realizado aportes científicos sobre el rol de PRL en la regulación del sistema inmune demostrando que niveles de PRL disminuidos durante la lactancia disminuyen la cantidad de linfocitos T presentes en glándula mamaria (54-57). Aunque la regulación de las diferentes isoformas del PRL-R ha sido estudiada extensivamente en el tracto reproductor femenino, su expresión en linfocitos T durante enfermedades autoinmunes es indiscutiblemente desconocida (58-65). Debido a que alteraciones en la activación de linfocitos T podrían contribuir al desarrollo de autoinmunidad, la identificación de nuevos blancos terapéuticos relacionados con estas células es de vital importancia para el diseño de nuevas terapias y marcadores pronósticos de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que existirían fallas en la expresión de las distintas isoformas del PRL-R que resultarían en alteraciones de la modulación de linfocitos T durante su activación influyendo en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes. En este plan de trabajo hemos evaluado la expresión de las diferentes isoformas del PRL-R en linfocitos T en estado

basal, activado y durante el desarrollo de autoinmunidad. Los datos que arroje este proyecto contribuirán a la comprensión de las interacciones entre el sistema inmune y endócrino en la salud y en la enfermedad.

## **Materiales y metodos**

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica y cultivos de las mismas de individuos sanos y pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Las células fueron estimuladas policlonalmente activando preferencialmente linfocitos T CD4 con Concanavalina A. La obtención de células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante gradiente de ficoll-hypaque. Se utilizó también PCR convencional. Esto nos permitió evaluar mediante corrida electroforética en geles de agarosa el producto de PCR y verificar el tamaño de nuestro amplicón. Como método de confirmación de los productos de PCR se realizó un estudio de secuenciación por método Sanger y se analizaron los datos por los softwares Sequencing Analysis v5.2 y SeqScape v2.5. Se purificó RNA y luego se sintetizó cDNA. Se utilizaron primers específicos para la determinación del PRL-RL (Fw, CCTGTCCAGGTTTCGCTGCAAA; Rv, AGATGAGCATCAAATCCTTTTA), PRL-RS1b, (Fw, TAAATGGTC TCCACCTACCCTGAT; Rv, CACCTCCAACAGATGAGCATCAAATCC) y se cuantificó actina como control utilizando los primers (Fw, AAAGACCTGTACGCCAACAC; Rv, GTCATACTCCTGCTTGCTGAT). Los niveles de cDNA (e indirectamente mRNA) específico fueron evaluados por PCR en Tiempo Real utilizando EVAGreen.

## **Resultados**

Teniendo en cuenta que hasta el presente no se ha estudiado el PRL-RS en células inmunes humanas decidimos evaluar la presencia del mismo mediante PCR convencional mediante un gel de agarosa. De forma esperada, las células inmunes expresan ambas isoformas del PRL-R. Así, la expresión de PRL-RS en leucocitos indica que éste podría inhibir la activación celular inducida por prolactina mediada por PRL-RL-prolactina. Estos resultados preliminares nos permitieron continuar avanzando en el estudio de la expresión de mRNA en células del sistema inmune.

Adicionalmente, para corroborar y continuar validando la técnica de PCR se procedió a secuenciar los productos de PCR específicos. Se obtuvo que ambos corresponden a las diferentes variantes de RNA del receptor de prolactina.

Por otro lado realizamos la determinación por citometría de flujo de la expresión proteica del receptor de prolactina en muestras leucocitarias de origen humano de individuos sanos indicando que células inmunes expresan cantidades cuantificables de receptor de prolactina total.

Posteriormente evaluamos la modulación de mRNA de PRL-RS/L en leucocitos durante su activación. Para ello células mononucleares de sangre periférica de 6 individuos controles fueron estimuladas con Concanavalin A por 24hs. Posteriormente se extrajo RNA y se sintetizó cDNA. Los ensayos de PCR en tiempo real, para determinar cuantitativamente los niveles de RNAm de las diferentes isoformas del receptor de prolactina, evidenciaron que la activación induce un aumento de la expresión de la isoforma larga y una disminución de la isoforma corta indicando una modulación

diferencial de ambas isoformas. Estos datos sugieren la existencia de una retroalimentación positiva respecto a la sensibilidad a PRL mediada por el receptor largo. Posteriormente evaluamos comparativamente la expresión de las diferentes isoformas del PRL-R en pacientes con LES. De forma interesante los pacientes con LES demuestran tener una expresión de ARNm aumentada de ambas isoformas PRL-RS1b y PRL-RL. Estos datos sugieren que en forma contraria a lo esperado, pacientes con LES presentan niveles elevados del PRL-RS lo cual atenuaría la sensibilidad a PRL. Estos datos promueven el uso de este estudio para ser utilizado como biomarcador de autoinmunidad.

## **Discusión**

La regulación de las diferentes isoformas del PRL-R y su activación han sido estudiadas principalmente en el tracto reproductor femenino. Por el contrario, la regulación de las diferentes isoformas en linfocitos durante enfermedades autoinmunes es desconocida. Con los datos obtenidos interpretamos que los protocolos planteados para la toma de muestra y procesamiento de esta han sido los correctos, ya que se ha obtenido una buena concentración de células mononucleares para el cultivo (teniendo en cuenta el poco volumen de extracción y la concentración de estos en pacientes en condiciones basales), a partir de esas células, se obtuvieron concentraciones de ARNm suficientes para la realización de las PCR. Mediante PCR-RT demostramos que los niveles de mRNA específico para PRL-R se expresa aproximadamente unas 1097 veces menos que el mRNA de actina y que su cuantificación es factible. Durante la activación celular observamos que el PRL-RL disminuye su expresión mientras que el corto la aumenta. Esto sugiere que durante la activación hay una disminución en la sensibilidad a PRL dada por una menor relación largo sobre el corto. Se comprobó la presencia de un único producto de PCR mediante curvas de melting. Los productos de PCR fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de BLAST, la cual indicó que se corresponden con un transcrito del receptor de prolactina humano; y mediante el análisis del software SeqScape v2.5 se realizó la alineación con NCBI Reference Sequence y determino que la muestra corresponde a "Homo sapiens prolactin receptor transcript RNA". Por último y de forma interesante, pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico demuestran tener una expresión de ARNm aumentada de ambas isoformas PRL-RS1b y PRL-RL, lo que implicaría que hay una disregulación en la sensibilidad a prolactina en LES. Como conclusión, los resultados obtenidos sugieren que nuestra técnica nos permite determinar los niveles de mRNA de las distintas isoformas de los receptores de PRL en cultivos celulares. Para nuestro conocimiento este es el primer reporte en el cual se demuestra que la expresión de mRNA de la isoforma corta 1b demostró disminuir su expresión durante la activación en células de individuos normales. Asimismo, este trabajo es el primero en sugerir que durante la activación las células inmunes aumentarían su sensibilidad a prolactina para que colabore con la proliferación celular. Por otro lado, de forma interesante, hemos sido los primeros en observar que pacientes con LES evidenciaron un aumento en la expresión de las diferentes isoformas del receptor de prolactina. Aunque todavía hay mucho trabajo por hacer estos resultados son prometedores y promueven el estudio del PRL-R como promoviendo este receptor como posible biomarcador de autoinmunidad.

## Bibliografía

1. K. Gratz *et al.*, *J Immunol*, (Jan 17, 2014).
2. Bergithe E. Oftedal *et al.*, *Immunity* **42**, 1185 (2015).
3. B. H. Hahn, *New England Journal of Medicine* **368**, 1528 (2013).
4. J. Suurmond, Y. R. Zou, S. J. Kim, B. Diamond, *Sci Transl Med* **7**, 280 (2015).
5. P. H. Li *et al.*, *Rheumatology* **52**, 337 (February 1, 2013, 2013).
6. F. Houssiau, E. Ginzler, *Lupus* **17**, 426 (May 1, 2008, 2008).
7. M. A. Atkinson, G. S. Eisenbarth, A. W. Michels, *The Lancet* **383**, 69.
8. M. J. Haller *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation* **125**, 448 (2015).
9. J. P. Mackern-Oberti, J. Obreque, G. P. Méndez, C. Llanos, A. M. Kalergis, *Clin Exper Immunol*, n/a (2015).
10. M. L. Breser, R. D. Motrich, L. R. Sanchez, J. P. Mackern-Oberti, V. E. Rivero, *The Journal of Immunology* **190**, 3121 (April 1, 2013, 2013).
11. R. D. Motrich *et al.*, *The Journal of Immunology* **177**, 957 (July 15, 2006, 2006).
12. J. P. Mackern-Oberti *et al.*, *Immunology* **140**, 123 (May 21, 2013).
13. R. D. Motrich *et al.*, *Clinical Immunology* **116**, 149 (2005).
14. A. A. Herrada *et al.*, *Immunology* **136**, 414 (Aug, 2012).
15. B. B. Ganesh, P. Bhattacharya, A. Gopisetty, B. S. Prabhakar, *Journal of Interferon & Cytokine Research* **31**, 721 (2011/10/01, 2011).
16. Y. Tomer, A. Huber, *Journal of Autoimmunity* **32**, 231 (2009).
17. W. J. Martin *et al.*, *Autoimmunity Reviews* **14**, 710 (2015).
18. M. Østensen *et al.*, *Autoimmunity Reviews* **14**, 376 (2015).
19. J. Venkatesh, E. Peeva, X. Xu, B. Diamond, *The Journal of Immunology* **176**, 3311 (March 15, 2006, 2006).
20. E. Peeva *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation* **111**, 275 (2003).
21. N. Ben-Jonathan, C. R. LaPensee, E. W. LaPensee, *Endocrine Reviews* **29**, 1 (2008).
22. J. P. Mackern-Oberti, S. R. Valdez, L. M. Vargas-Roig, G. A. Jahn, *Reproduction* **146**, 233 (September 1, 2013, 2013).
23. C. Clapp, J. Aranda, C. González, M. C. Jeziorski, G. M. de la Escalera, *Trends in Endocrinology & Metabolism* **17**, 301 (2006).
24. K. Ushizawa, T. Takahashi, M. Hosoe, K. Kizaki, K. Hashizume, *Molecular and Cellular Endocrinology* **323**, 277 (2010).
25. D. R. Grattan, I. C. Kokay, *Journal of Neuroendocrinology* **20**, 752 (2008).
26. V. Bernard, J. Young, P. Chanson, N. Binart, *Nat Rev Endocrinol* **11**, 265 (2015).
27. S. R. Valdez, A. B. Penissi, R. P. Deis, G. A. Jahn, *Reproduction* **133**, 827 (April 1, 2007, 2007).
28. S. R. Valdez, M. M. Bonafede, N. B. Carreño, R. P. Deis, G. A. Jahn, *Stress* **15**, 361 (2012).
29. N. Ben-Jonathan, J. Mershon, D. Allen, R. Steinmetz, *Endocrine Reviews* **17**, 639 (1996).
30. C.-C. Chen *et al.*, *Genes & Development* **26**, 2154 (October 1, 2012, 2012).
31. K. Chavez-Rueda *et al.*, *Clinical Immunology* **116**, 182 (2005).
32. M. E. Freeman, B. Kanyicska, A. Lerant, G. Nagy, *Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion*. (2000), vol. 80, pp. 1523-1631.
33. M. Fahie-Wilson, T. P. Smith, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27**, 725 (2013).
34. D. Paraiba *et al.*, *Clin Exp Rheumatol* **28**, 0866 (2010).
35. M. Karimifar, A. Tahmasebi, Z. Bonakdar, S. Purajam, *Rheumatol Int* **33**, 511 (2013/02/01, 2013).
36. Z. Rezaieyazdi, A. Hesamifard, *Rheumatol Int* **26**, 1036 (2006/09/01, 2006).
37. H. Orbach *et al.*, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1109**, 385 (2007).
38. M. V. Legorreta-Haquet *et al.*, *Clinical and Developmental Immunology* **2013**, 11 (2013).
39. Q. Qian *et al.*, *Journal of Immunology Research* **2015**, 6 (2015).
40. V. De Mello-Coelho, W. Savino, M.-C. Postel-Vinay, M. Dardenne, *Dev Immunol* **6**, (1998).
41. K. Takizawa, S. Kitani, F. Takeuchi, K. Yamamoto, *Endocrine Journal* **52**, 635 (2005).

42. D. Xu, L. Lin, X. Lin, Z. Huang, Z. Lei, *Cellular Immunology* **263**, 71 (2010).
43. L. Yang, Y. Hu, X. Li, J. Zhao, Y. Hou, *International Immunopharmacology* **6**, 1478 (2006).
44. C. Bole-Feysot, V. Goffin, M. Edery, N. Binart, P. A. Kelly, *Endocr Rev* **19**, 225 (1998/06/01, 1998).
45. R. Dagil *et al.*, *Structure* **20**, 270 (2012).
46. Z.-Z. Hu, J. Meng, M. L. Dufau, *J Biol Chem* **276**, 41086 (November 2, 2001, 2001).
47. J. B. Kline, C. V. Clevenger, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 24760 (July 6, 2001, 2001).
48. A. M. Qazi, C.-H. Tsai-Morris, M. L. Dufau, *Molecular Endocrinology* **20**, 1912 (2006).
49. V. Goffin, J. A. Martial, N. L. Summers, *Protein Engineering* **8**, 1215 (December 1, 1995, 1995).
50. F. Gouilleux, H. Wakao, M. Mundt, B. Groner, *The EMBO Journal* **13**, 4361 (1994).
51. J. J. Berlanga *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2050 (January 24, 1997, 1997).
52. J. Bouilly, C. Sonigo, J. Auffret, G. Gibori, N. Binart, *Mol Cell Endocr* **356**, 80 (2012).
53. Y. Sangeeta Devi, J. Halperin, *Molecular and Cellular Endocrinology* **382**, 400 (2014).
54. S. M. Varas, G. A. Jahn, *Endocrine Research* **31**, 357 (2005).
55. G. A. Jahn *et al.*, *Biology of Reproduction* **57**, 894 (1997).
56. R. L. Bogorad *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14533 (September 23, 2008, 2008).
57. P. J. Newey *et al.*, *New England Journal of Medicine* **369**, 2012 (2013).
58. D. L. Clarke, B. J. Arey, D. I. Linzer, *Endocrinology* **133**, 2594 (1993).
59. M. Nagano, P. A. Kelly, *Journal of Biological Chemistry* **269**, 13337 (May 6, 1994, 1994).
60. K. Dorshkind, N. D. Horseman, *Endocrine Reviews* **21**, 292 (2000).
61. S. L. Urtishak, E. A. Mckenna, A. M. Mastro, *Developmental Immunology* **8**, (2001).
62. C. Clapp, R. I. Weiner, *Endocrinology* **130**, 1380 (1992).
63. K. Bajou *et al.*, *Nat Med* **20**, 741 (2014).
64. M. R. Gyetko *et al.*, *The Journal of Immunology* **168**, 801 (January 15, 2002, 2002).
65. V. Moulton, G. Tsokos, *J Clin Invest* **125**, 2220 (2015).

## **Abstract**

Specific therapies for systemic autoimmune disorders such as Systemic Lupus Erythematosus have not yet been developed. Studies in humans indicate that there is an association between hyperprolactinemia and autoimmune diseases, suggesting an important role of prolactin (PRL) in these disorders. The actions of PRL are mediated by its receptor (PRL-R) which can have different isoforms including a long isoform (PRL-RL) formed by an extracellular domain, a transmembrane domain and an intracellular signal transducer. The short isoform (PRL-RS) lacks the cytoplasmic domain and therefore does not possess intracellular signaling. The PRL-RS and PRL-RL isoforms are co-expressed in different tissues including lymphatic organs however, their expression in immune cells from autoimmune patients is unknown. Additionally, although the regulation of the different isoforms of PRL-R has been studied extensively in the female reproductive tract, its expression in cells during immune cell activation is unknown. Our hypothesis is that there would be faults in the expression of the different isoforms of PRL-R that would result in alterations in the modulation of T lymphocytes during their activation, influencing the susceptibility to develop autoimmune diseases. Here we have demonstrated that the expression of the different isoforms of PRL-R in activated peripheral blood mononuclear cells are differentially modulated in which PRL-RL is upregulated and PRL-RS1b is downregulated compared to the basal state. Additionally, we have demonstrated that Systemic Lupus Erythematosus patients showed an increased expression of both isoforms, PRL-RL and PRL-RS1b. The data provided by this project will contribute to the understanding of the interactions between the immune and endocrine systems in health and disease. Although there is still much work to be done, these results are promising and promote the study of PRL-R as promoting this receptor as a possible biomarker of autoimmunity.



# EPIDEMIOLOGÍA MICROBIANA EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA II

Dr. Pablo F. Martina

Laboratorio Grupo de Investigación en Genética Aplicada (GIGA)- Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (IBS, UNaM-CONICET). Lugar de realización: Hospital pediátrico de la ciudad de Posadas Dr. F. Barreyro, Posadas, Misiones Argentina y Laboratorio GIGA (FCEQyN-UNaM/CONICET)

## Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad genética hereditaria más frecuente y en nuestro país posee una incidencia de 1 cada 5000 nacidos, sin embargo se cree una estimación subvalorada ya que menos del 50% de los infantes son diagnosticados. En la Provincia de Misiones no existen datos oficiales pero se estima que habría más de 260 personas con FQ. A nivel genético, la FQ resultante de mutaciones en un gen regulador de transmembrana afecta funciones pancreáticas, pulmonares e intestinales. A nivel pulmonar la enfermedad lleva a la acumulación de un mucus espeso que crea un ambiente propicio para la colonización y desarrollo de microorganismos en el tracto respiratorio. Estas infecciones causan un progresivo deterioro de la función pulmonar produciendo en muchos casos la muerte prematura del paciente. Entre las especies bacterianas relevantes capaces de generar infecciones pulmonares crónicas se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y organismos pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia* (CBC). Si bien *P. aeruginosa* constituye el organismo más comúnmente asociado con la mortalidad y morbilidad de esta enfermedad, durante la última década otras especies bacterianas Gram-negativas no-fermentadoras, tales como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Klebsiella spp.*, *Pandoraea spp.*, *Bordetella spp.* y *Ralstonia spp.* han sido aisladas de muestras de esputo de pacientes FQ. A pesar de que la frecuencia de infección con estas últimas especies es relativamente baja y su significado clínico aún no está aclarado, todas ellas presentan un importante desafío para el diagnóstico de laboratorio ya que son difíciles de identificar y a menudo se las confunde con CBC. En el caso particular de CBC, es un grupo con taxonomía dinámica constituido de 22 especies que las técnicas bioquímicas convencionales no permiten discriminarlos. Hoy sabemos que su presencia resulta sumamente peligrosa para el hospedador causando en un número variable de pacientes una septicemia incontrolable conocida como síndrome cepacia. Es lógico entender, teniendo en cuenta el amplio y atípico cuadro microbiano descrito, que para los laboratorios de bacteriología no resulte sencillo la discriminación e identificación precisa entre toda esta variedad de organismos. Es reconocido, que las infecciones pulmonares crónicas se caracterizan por la alta carga bacteriana, y que la exposición frecuentes a tratamientos con antibióticos se consideradas un importante factor de desarrollo de resistencia antimicrobiana en los microorganismos que infectan estos pacientes. Las elevadas frecuencias de mutación en

estas poblaciones, crecidas adheridas a superficies como biofilm, contribuyen a aumentar la variabilidad genética entre los aislados, favoreciendo la emergencia de nuevos fenotipos que incrementan el grado de dificultad en su identificación. Como se puede inferir y se reporta en la bibliografía, los estudios taxonómicos en cultivos de secreciones pulmonares de estos pacientes son de una complejidad tal que superan el poder de identificación de los métodos bioquímicos tradicionales. En ese sentido, las técnicas bioquímicas empleadas de rutina para la caracterización e identificación de microorganismos aislados de pacientes FQ infectados, demandan tiempos excesivos, son costosas y sus resultados tienen un alto grado de incertidumbre. Esto no sólo ocasiona importantes demoras en la aplicación del tratamiento antimicrobiano, crucial para la vida del paciente, sino que en muchos casos los errores en el diagnóstico microbiológico (10 al 30%) resultan fatales.

En vista a esta realidad, este proyecto es continuación del proyecto "Epidemiología microbiana y diversidad genética del pulmón fibroquístico" y como principal objetivo continuo profundizando el conocimiento de la realidad epidemiológica local de la enfermedad. En este contexto se busca implementar el programa informático libre "CFC database", para la monitorización de historia clínica de cada paciente FQ.

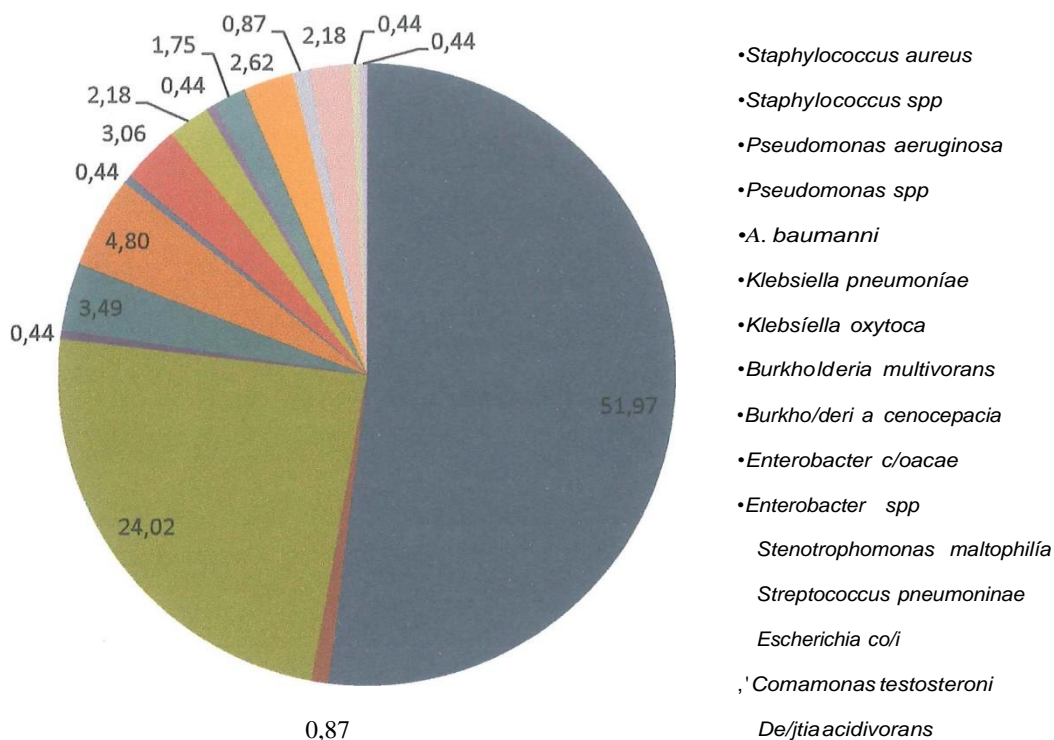
## **Actividades realizadas durante el Proyecto**

### **Análisis epidemiológico**

Se realizó un estudio descriptivo transversal durante el período comprendido entre Agosto de 2016 y Octubre 2018. Se documentaron 194 muestras de secreciones respiratorias provenientes de 32 pacientes pediátricos con FQ, que concurren a control a la Institución. Las muestras fueron sembradas en Agar Chocolate, Agar Sangre, Agar *Selectivo Burkholderia cepacia*, Agar Mac Conkey y Agar Manito! salado, e incubadas en estufa a  $35\pm 2$  °C por cinco días. Los microorganismos aislados se tipificaron según las pruebas bioquímicas convencionales. Las cepas sospechosas de pertenecer al complejo *Burkholderia cepacia* (CBc) fueron confirmadas por PCR del gen *recA*, seguido de digestión con enzima restricción *Hae/II* o secuenciación. También se empleó la secuenciación del gen ARN 16s. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa R versión 3.3.1.

En el total de las muestras procesadas en el laboratorio cuatro fueron negativas no habiéndose constatado desarrollo microbiano luego del período de incubación. A partir de las muestras positivas (n=194) se logró recuperar 269 aislamientos bacterianos, fúngicos y en el 90% de los mismos hubo desarrollo de flora mixta no significativa.

Se identificaron de microorganismos habituales en la microflora de los pacientes FQ, correspondiéndose aproximadamente el 81,30/o de los aislamientos con los principales patógenos usualmente asociados con ésta patología: *Staphylococcus aureus* (52°/o), *Pseudomonas aeruginosa* (24o/o) y especies del Complejo *Burkholderia cepacia* (5,3°/o). Los otros cultivos bacteriológicos restantes se presentan en la figura 1 y no se incluyen hongos o levaduras.



**Figura 1. Distribución de especies recuperadas a lo largo del estudio.**

**Staphylococcus aureus**

Se lo relacionó con 20 pacientes, 9 niñas y 11 niños, a partir de los cuales se obtuvieron un total de 119 muestras. La edad media en meses de esta población fue de 118 meses, con un mínimo de 1 meses y un máximo de 332 meses. La distribución de muestras por paciente se muestra en la fig 2.

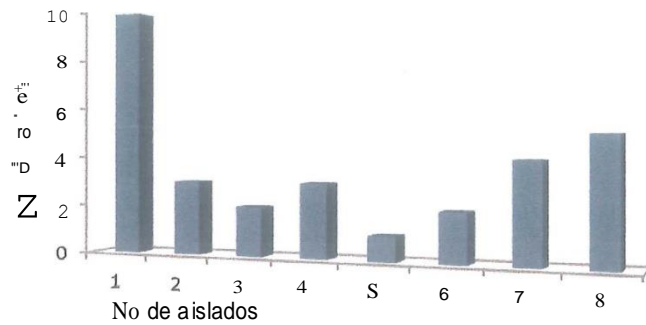


Fig 2. Distribución de los aislamientos de *S. aureus* recuperados por cada paciente.

### *Pseudomonas aeruginosa*

Este microorganismo se aisló de 19 pacientes, 11 niñas y 8 niños. Se registraron un total de 55 muestras diferentes. La media de edad de esta población fue de 119 meses con una edad mínima de 5 meses y una edad máxima de 329 meses. La figura 3 muestra la distribución de muestras estudiadas por paciente. El perfil de resistencia a antimicrobianos se especifica en la tabla n°2.

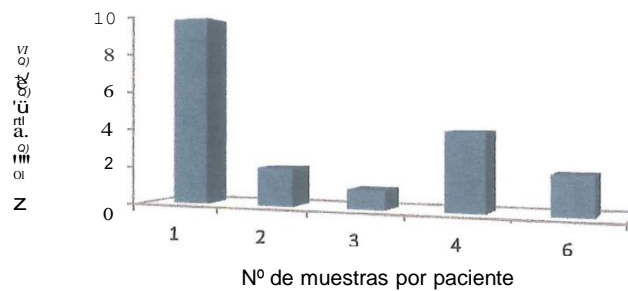


Fig 3. Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados por paciente.

### Complejo *Burkholderia cepacia* (CBC)

Los aislamientos de CBC recuperados se relacionaron exclusivamente con 4 pacientes. Se registraron 15 muestras positivas, perteneciente a *B. multivorans* y *B. cenocepacia*. La edad media de esta población fue de 173 meses, con un mínimo de 133 meses y un máximo de 188 meses. La distribución de los aislamientos de CBC por paciente se muestra en la Figura n° 4.

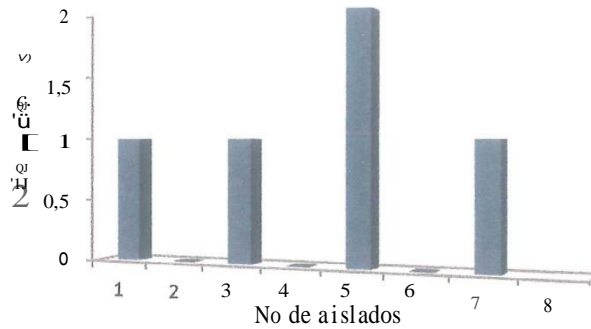


Fig 4. Distribución de los aislamientos de CBC recuperados por paciente.

#### Determinación del perfil de susceptibilidad.

Se realizara antibiograma por difusión en disco siguiendo las normas CLSI 2015 y recomendación de Red WHO a modo de screenig fin de detectar cepas con perfiles de resistencia sospechosas de porta metalo-b-lactamasas que puedan diseminarse entre los pacientes FQ. No se implementaron los métodos fenotípicos (Hodge modificado- Sinergia de disco) o los métodos genéticos (PCR genes blaKPC, blaVIM, blaIMP, blaNDM, etc), debido que los perfiles observadas corresponde a resistencia intrínseca de las especies. Se presentan a continuación en las tablas los valores expresados en porcentaje, de los principales antibióticos analizados.

Tabla n°1. Perfil de sensibilidad en aislamientos de *S. aureus* recueprados.

Antibiótico	R*	I**	S***
vancomicina	4	22	74
ciprofloxacina	18	0	82
clindamicina	18	2	80
eritromicina	46	6	48
gentamicina	28	13	59
teicoplanina	0	2	98

Referencia: %\*número de aislamientos con resistencia alta, % \*\*número de aislamientos con resistencia intermedia; % \*\*\*número de aislamientos susceptibles.

**Tabla n°2. Perfil de sensibilidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados.**

<b>Antibiótico</b>	<b>R*</b>	<b>I**</b>	<b>S***</b>
aztreonam	12	0	88
cefepime	8	8	83
ceftazidima	13	4	83
ciprofloxacina	9	0	91
gentamicina	5	23	73
imipenem	8	4	88
meropenem	10	10	81
piperacilina	13	0	88
piperacilina/tazobactam	29	0	71

**Tabla n°3. Perfil de sensibilidad de los aislamientos de *B. multivorans* recuperados.**

<b>Antibiótico</b>	<b>R*</b>	<b>I**</b>	<b>S***</b>
Ceftazidima	50	0	50
Meropenem	28	14	58
Imipenem	88	12	0
Cefepime	50	0	50
Minociclina	88	12	0
trimetoprima/sulfametoxazol	-	-	-

**Tabla n°4. Perfil de sensibilidad de los aislamientos de *B. cenocepacia* recuperados**

<b>Antibiótico</b>	<b>R*</b>	<b>I**</b>	<b>S***</b>
Ceftazidima	24	0	76
Meropenem	0	0	100
Imipenem	88	12	0
Cefepime	12	0	88
Minociclina	76	12	12
trimetoprima/sulfametoxazol	24	12	76

Referencia: %\* número de aislamientos con resistencia alta, %\*\* número de aislamientos con resistencia intermedia; % \*\*\* número de aislamientos susceptibles.

## Implementación, cargado y utilización de CFC Database.

El sistema CFC database opera sobre una plataforma Servoy, donde se implementó una base de datos relacional PostgreSQL, que permite establecer interconexiones entre los datos almacenados en las tablas, y a través de dichas conexiones relacionar los datos de las diferentes tablas. Así este sistema, admite el interconectar los registros provenientes de la patología del paciente con FQ (ingreso, datos clínicos, datos microbiológicos, tratamientos, imágenes, etc.). Se logro cargar 70o/o de los datos (registro epidemiológico y clínico) previstos. El entrenamiento de los usuarios no logro realizarse debido a la interrupción de la funciones de un miembro del proyecto. Sin embargo, esta actividad será completada posteriormente. En la figura (fig 5) de abajo puede observa parte del procedimiento.

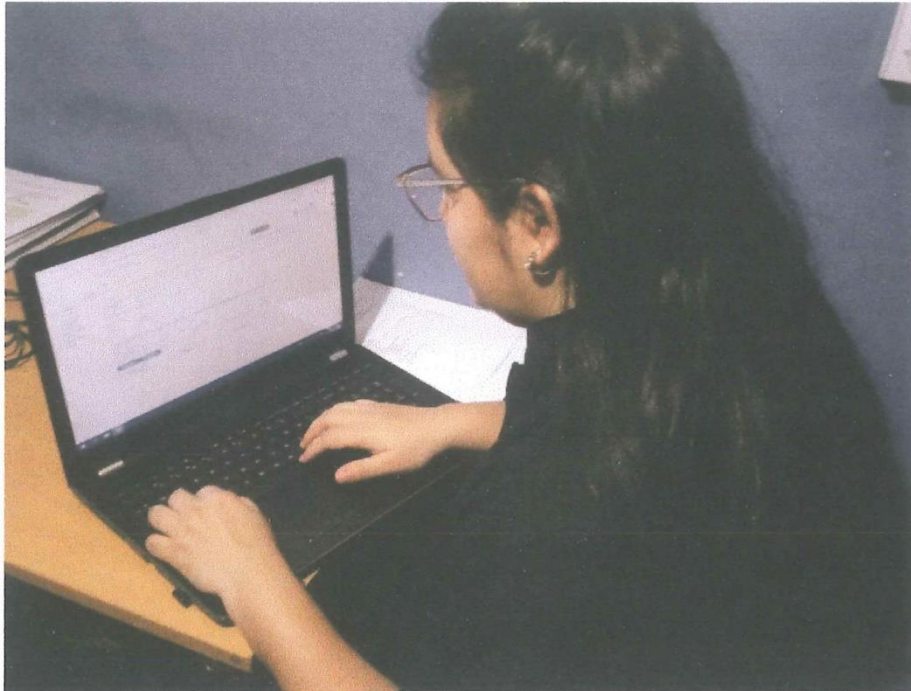


Figura 5. Ana Laura Rodríguez, becaria CEDIT asociada al proyecto. Implementando el software CFC database al manejo de datos de pacientes FQ.

## Discusión y Conclusiones

El presente estudio muestra las características epidemiológicas de las infecciones respiratorias y sensibilidad a antibióticos en los pacientes con FQ en el Hospital Dr. F. Barreyro. La edad media de diagnóstico de nuestros pacientes es algo más alta que en los registros nacionales (probablemente relacionado con la no realización de un *sreening* neonatal).

Durante los 25 meses de estudio, cerca del 52% presentaron cultivos de esputo positivos para *Staphylococcus aureus*, siendo a diferencia de otros registros, donde fa *Pseudomonas aeruginosa* el germen más frecuente. La proporción de cultivos con presencia de *Pseudomonas* aumenta de forma progresiva desde el nacimiento con la edad, de manera similar a *Burkholderia cepacia* que aparecen a una edad media de 14 años en nuestros pacientes.

En cuanto a la mortalidad observada, en el 50% de los casos (4 pacientes) se produjo luego de

una colonización crónica entre 3,5 y 6,5 años, en las cuales especies de Complejo *Burkholderia cepacia* fueron principalmente dominantes al tiempo del deceso; en los restantes pacientes, los decesos ocurrieron dentro del primer año de vida y en los cuales *S. aureus* y *P. aeruginosas* fueron aisladas.

La aplicación de técnicas moleculares permitió detectar la presencia de nuevas especies poco frecuente de microorganismos, modificando el cuadro epidemiológico. En esta a las resistencias exhibidas, la implementación de una vigilancia epidemiológica continua, tanto de la flora microbiana recuperada como de sus perfiles de resistencia, es una necesidad de suma importancia a fin de generar información de valor a ser tenida en cuenta en el momento de establecer la terapia antimicrobiana empírica a pacientes fibroquísticos.

En conclusión, los datos observados en nuestra población, nos deben hacer replantear a corto-medio plazo los niveles organizativos de la atención integral a esta patología.

## **Logros destacables**

En el transcurso de estos 4 años se afianzaron un equipo de trabajo, integrando por el sistema de salud público y la Universidad. Se capacitó a un integrante del servicio de microbiología del Hospital Dr. F. Barreyro de la ciudad de Posadas. Se pusieron a punto metodología para identificación a nivel de especies bacterianas mediante amplificación y secuenciación del gen 16S. Se puso a punto metodología de identificación de especies frecuentes del Complejo *Burkholderia cepacia* mediante amplificación por PCR y digestión enzimática. Se estableció e enriqueció un cepario de aislados recuperados de pacientes con fibrosis quística. Se realizó entrenamiento y cargado parcial de datos en el programa CFC database al manejo de datos de pacientes.

## **Aportes a la Comunidad Científica**

Resultados parciales de este proyecto fueron enviados y aceptados a publicar a la Revista Argentina de Microbiología (RAM - IF 1.157), se menciona el patrocinio de la **Fundación J. A. Roemmers**. Además fueron comunicados en IV Congreso Argentino de Fibrosis Quística. (Anexo)

## **Dificultades encontradas en la Investigación**

Durante el desarrollo del proyecto se presentaron 2 dificultades. Una integrante del equipo del proyecto fue suspendida por falta de fondos del pago de su beca de investigación (Beca del Gobierno de la provincia de Misiones), suspendiendo su actividad. Por otro lado, la mayor complicación se debió al aumento de precio de los insumos importados y servicio de secuenciación de ADN, luego de la devaluación de la moneda nacional lo cual no estaba contemplado en el presupuesto (Agosto 2016 a \$14,50 a Septiembre 2018 \$ 41,20), generó restricción e imposibilitó la compra de insumos para poder desarrollar la totalidad de los objetivos planteados.



*Anexo*

Elsevier Editorial System(trn) for Revista Manuscript Draft Argentina de Microbiología

Manuscript Number: RAM-D-19-00008

Title: Burkholderia cepacia complex: 11 years of surveillance in patients with Cystic Fibrosis in Posadas, Argentina.

Article Type: Original

Keywords: Complejo Burkholderia cepacia; Fibrosis Quística; Infección crónica; Resistencia antibiótica.

Burkholderia cepacia complex; cystic fibrosis; Chronic infection; Antibiotic resistance.

Corresponding Author: Dr. Pablo Martina, Ph.D Corresponding Author's Institution: FCEQyN - UNaM First Author: Pablo Martina, Ph.D

Order of Authors: Pablo Martina, Ph.D; Mónica Martínez; Sebastián Rivas; Lorena Leguizamón; Martha Von Specht; Julián Ferreas

## Abstract

Cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex pulmonary infections have high morbidity and mortality. Worldwide, this disease is undergoing substantial epidemiological changes. Advances in the diagnosis and treatment have conditioned an increase in child survival as well as the proportion of affected adults. In order to know our reality, we refer to an epidemiological study in 64 CF patients during 11 years of surveillance, focusing on infections caused by *Burkholderia* species.<sup>5</sup> Conventional and automated phenotypic tests, restriction fragment length polymorphism-recA, 16S rDNA and recA genes sequencing, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry were applied. Bacterial isolates were also tested for antimicrobial susceptibility patterns. Based on recA gene sequencing, the most common species identified were *Burkholderia cenocepacia* (67.3%) and *Burkholderia vietnamiensis* (20.3%). Levofloxacin, cefepime, ceftazidime, and meropenem were the most active, inhibiting 67%, 62%, 51%, and 46% of strains, respectively. This report represents the first systematic study of *Burkholderia* infections in our CF population since beginning of monitoring and treatment, and highlights the importance of continued longitudinal studies.

**\*Primera página / First page**

## **Title**

*Burkholderia cepacia* complex: 11 years of surveillance in patients with Cystic Fibrosis in Posadas, Argentina

## **Author names and affiliations**

Pablo F. Martino<sup>a,c</sup>, Mónica Martínez<sup>b</sup>, Sebastián Rivas<sup>b</sup>, Lorena Leguizamón<sup>b</sup>, Martha Von Speche<sup>b</sup>, Julián Ferreasa<sup>c</sup> \*

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552. Posadas (3300), Misiones

<sup>b</sup> Hospital Provincial de Pediatría Dr F. Barreyro. M. Moreno 110, Posadas (3300), Misiones

<sup>c</sup> Instituto de Biología Subtropical (IBS), CONICET-UNaM. Ituy 1745 Posadas (3300), Misiones, Argentina

## **Corresponding autor**

\* [pfinanina@hotmail.com](mailto:pfinanina@hotmail.com) / [juf1003@gmail.com](mailto:juf1003@gmail.com)

Tel +54 376 444 0967

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Funding**

This work was partially funded by a grant from Foundation A. J. Roemmers.

## **Author's contribution**

JF and MVS coordinated the design and data acquisition. PFJ, JF, MM and MVS analyzed and interpreted the results. SR, PFM, MM, MVS and LL were responsible for the microbiology analysis. PFM and MM drafted the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## **Acknowledgements**

To the doctors Guillenno Frada and Carolina Barrías for their contributions.

## INDICADORES DE CONTAMINACIÓN VIRAL DE ALIMENTOS. CÓRDOBA ARGENTINA

Dra. Gisela Masachessi, Dra. Silvia V Nates, Dr. Jorge V Pavan, Laura C Martínez, Mag. María B Isa, Mag. Miguel O Giordano, Lic. Verónica Prez

Instituto de Virología Dr. JM. Vanella- Facultad de Ciencias Médicas-  
Universidad Nacional de Córdoba

### **Síntesis del informe final**

El desarrollo de tecnologías moleculares aplicadas a estudios ambientales ha permitido establecer una alta prevalencia de virus entéricos (que se transmiten por vía fecal-oral) en el ambiente, en particular en matrices acuosas superficiales tales como ríos, embalses y canales de riego, entre otros (Kotwal, 2014). Estudios filogenéticos de estos virus revelan su elevada homología con los hallados en aguas residuales, lo que hace inferir que el origen de virus entéricos en aguas superficiales estaría ligado al vertido de las aguas residuales con elevada carga microbiana. Los virus entéricos son excretados por materia fecal en altas concentraciones, entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas virales por gramo, permanecen viables en las matrices acuosas y su baja dosis infectiva (1-10 partículas) da cuenta de su potencial patogénico. Cuando estas aguas son utilizadas para riego de alimentos que se consumen sin procesos de cocción, como es el caso de verduras de hojas verdes, se originan nuevos escenarios epidemiológicos de transmisión viral y como resultado se multiplica el riesgo de infección a la población (Pérez-Rodríguez et al., 2014). Los virus entéricos asociados a escenarios alimentarios son los norovirus (NoVs) y rotavirus (RV), principales agentes etiológicos de diarreas agudas (Glass RI, 2013), enterovirus humanos, agentes etiológicos de meningitis y encefalitis y los virus de la hepatitis A (HAV) y E (HEV), agentes etiológicos de hepatitis agudas (Koopmans et al., 2004; Fiore, 2004; Kokkinos et al., 2012; European Food Safety Authority, 2013; 2014; Quiroz-Santiago et al., 2014; Bouwknecht et al., 2015).

Datos aportados por nuestro grupo de trabajo demuestran la circulación de virus entéricos (NoVs, HAV, HEV, enterovirus humanos y RV), en aguas residuales y recreacionales locales, las cuales suelen ser usadas para riego (Blanco Fernández et al., 2012, Yanez et al., 2014, Martínez Wassaf et al., 2014, Barril et al., 2015). Resultados comparables han sido reportados por otros autores tanto en países en desarrollo como desarrollados (Korajkic A. et al, 2011, Mans J. et al, 2013).

Finalmente, el Código Alimentario Argentino (Ley 18284, Decr.Regl 2126/71) entiende por “Hortaliza fresca la de cosecha reciente y consumo inmediato en las condiciones habituales de expendio”. Refiere “que deberá realizarse la evaluación del riesgo de infección alimentaria a través de un modelo científicamente aceptado señalando el tipo de consecuencias para la salud y el perfil y tamaño de la población en riesgo”. La contaminación de los alimentos por virus de entéricos, es considerada actualmente como la principal fuente de enfermedades infecciosas y es un área de estudio en creciente desarrollo en el mundo.

Este proyecto se basó en una gestión integrada de investigadores que permitió incorporar conocimiento en nuestro país, respecto a matrices alimentarias contaminadas con virus. Se realizaron técnicas de diagnóstico de situación del escenario local, con tecnologías moleculares de detección de virus con impacto en salud humana y cuantificación de riesgo de infección viral por consumo de alimentos contaminados. Se tiene que profundizar los estudios sobre los marcadores virales que mejor resultados arrojen sobre la presencia de virus con impacto en salud.

Los datos obtenidos son los primeros disponibles en el país y podrán ser la base para implementar medidas de control para la protección de la salud de la población.

Durante julio-diciembre de 2012, se recolectaron hortalizas de granjas verdes periurbanas (n = 19) y sus correspondientes aguas de riego de ríos urbanos (n = 12). Además, se recolectaron muestras de aguas residuales urbanas (n = 6) para analizar las variantes virales que circulan en la comunidad. Conjuntamente, se colectaron 101 muestras frescas de lechuga, achicoria, rúcula, y/o espinaca de dos unidades productivas de vegetales de la localidad de Colonia Caroya y cada quince días se tomaron muestras de 1,5 L del agua empleada para el riego de los vegetales (n=24). Los virus se eluyeron y se concentraron mediante precipitación con polietilenglicol y se realizó ensayos con técnicas moleculares y celulares. La frecuencia de detección de los grupos virales en aguas residuales, agua de riego y cultivos en Córdoba fue: norovirus 100%, 67% y 58%, rotavirus 100%, 75% y 5%, astrovirus 83%, 75% y 32%, PBV 100 %, 30% y 18% y enterovirus infeccioso 50%, 33% y 79%, respectivamente. Un perfil similar en aguas residuales, agua de riego y vegetales verdes se observó para la distribución de genogrupos de norovirus (I y II), así como para los tipos G de rotavirus y astrovirus. Estos resultados proporcionan los primeros datos para Argentina señalando que las verduras de hoja verde están contaminadas con una amplia gama de virus entéricos y que el agua de riego sería una fuente de contaminación. La presencia de genomas virales y partículas infecciosas en los alimentos que, en general, son suficientes para el tratamiento antes del consumo, subraya que los cultivos verdes pueden actuar como fuentes potenciales de transmisión del virus entérico. Se tiene que profundizar los estudios sobre los marcadores virales que mejor resultados arrojen sobre la presencia de virus con impacto en salud. Se necesita intervención pública en el uso de las aguas del río como fuente de riego.

## **Resultados y conclusiones del trabajo de investigación**

Los vegetales de hoja verde son componentes importantes de las dietas humanas actuales, pero son uno de los principales alimentos involucrados en la transmisión de virus entéricos humanos, ya que se comen crudos y, por lo general, sin más procedimientos de lavado / descontaminación (Little y Gillespie, 2008). Las verduras pueden estar contaminadas por estos virus en las etapas de pre y/o post cosecha. En la etapa posterior a la recolección, la fuente principal de contaminación viral puede ser atribuible a los manipuladores de alimentos infectados con virus entéricos involucrados durante la recolección, el empaque y/o la preparación de alimentos (Daniels et al., 2000). Tal es así que, Bidawid y col. (Bidawid et al., 2000) demostraron que el 9.2% de las partículas virales infecciosas presentes en las manos contaminadas de manipuladores pueden transferirse a la lechuga durante su manipulación.

En la etapa de precosecha en la granja, los alimentos pueden contaminarse durante la etapa de crecimiento por contacto con fertilizantes contaminados, aguas residuales o el uso de agua de riego contaminada con materia fecal (Directorate, 2002). Esto es

particularmente relevante cuando los alimentos son vegetales de hojas verdes que se comen sin cocción previa (alimentos crudos) (Cheong et al., 2009).

La aplicación de control microbiológico para medir calidad del agua se basa en parámetros bacterianos, si bien estos parámetros han ayudado a mejorar el saneamiento del agua para proteger la salud, tiene limitaciones y puede a veces ser inapropiado para evaluar la presencia de virus en aguas contaminadas. Esto es debido a que los indicadores bacterianos no son un reflejo de la calidad virológica del agua, ya que las bacterias presentan una menor resistencia a los procesos de tratamiento de agua y a la autodepuración natural que los virus (Scandura y Sobsey, 1997; Pusch et al., 2005; Blatchley 3rd et al., 2007; Lambertini et al., 2011; Payment y Locas, 2011). A su vez, los virus entéricos pueden ingresar a las aguas superficiales a través de una ruta directa de descarga de aguas residuales tratadas. En la actualidad no existe una regulación que determine el control de virus entéricos en matrices acuosas en Argentina.

Para contribuir al conocimiento sobre la contaminación viral en vegetales crudos, en este estudio se aplicaron métodos moleculares cualitativos y cuantitativos para detectar y caracterizar los virus entéricos en el agua de riego, cloacas y las muestras seleccionadas para el cultivo en Córdoba, Argentina.

Un gran inconveniente del ensayo de RT-PCR utilizado en la detección de virus es su incapacidad para determinar la viabilidad y la infectividad de los virus detectados. De esta manera, las técnicas moleculares pueden detectar tipos infecciosos y no infecciosos. Los tipos no infecciosos en una muestra podrían atribuirse a factores naturales como la luz solar, la temperatura y la humedad que podrían disminuir o inactivar la infectividad de virus. Por lo tanto, la presencia de ácidos nucleicos virales no necesariamente indica la presencia de virus infecciosos (Hamza et al., 2009). De esta manera, la detección molecular de virus entéricos puede no estar confirmando el papel de los vegetales como vehículos transmisores de virus entéricos infecciosos. Para superar esta limitación, en el presente estudio, se proporcionaron datos sobre enterovirus infeccioso para evaluar la infectividad de las partículas virales presentes en el agua de riego, verduras asociadas y cloacas. De acuerdo con el límite de detección de iEV por amplificación de cultivo celular acoplado a un ensayo de inmunofluorescencia directa determinado previamente, cada muestra detectada como "iEV positiva" es una fuente potencial de infección. La evidencia de la viabilidad del EV podría indicar condiciones de matriz adecuadas para mantener la infectividad de los otros virus analizados por detección genómica.

Los resultados revelaron evidencia de detección frecuente de NoV, RV, HAstV, PBV y iEV en el agua de riego y también en las verduras de hoja verde analizadas asociadas y de cloacas. Esto muestra que la contaminación de las matrices se produjo durante todo el período estudiado, en meses de frío y calor.

Las aguas residuales revelaron la circulación continua en la comunidad de NoV, RV, PBV y HAstV, pero se detectó iEV en el 50% de las muestras, lo que podría ser una consecuencia de la presencia de sustancias inhibitorias en estas muestras sucias que impiden la amplificación del EV viable los cultivos celulares. Se detectaron en aguas residuales los genotipos NoV GI y GII, RV G1 – G4 y G9, y HAstV G5 y G7 representando un patrón de especies virales que circulan en la comunidad similar al observado en las aguas de riego contaminadas. Esta situación sugiere que las aguas superficiales utilizadas para riego están recibiendo la descarga de aguas residuales locales no tratadas o mal tratadas. Desafortunadamente, esta situación parece ser un hecho común en diferentes regiones del mundo. Los datos publicados informan sobre la presencia de virus en diferentes entornos acuáticos que siguiendo la ruta de contaminación de las aguas residuales sin tratar son descargadas a aguas superficiales (Iaconelli et al., 2015; Rusinol et al., 2015).

Además, los resultados obtenidos indican que los genotipos que circulan en la comunidad también se detectan en vegetales de hojas verdes, lo que sugiere que el agua de riego está contaminada y podría ser una fuente de contaminación vegetal con partículas virales.

Cabe destacar que el iEV se detectó con mayor frecuencia en hortalizas verdes (79%) en comparación con la frecuencia detectada en muestras de aguas residuales (50%) y de agua de riego (33%), esto podría deberse a la unión del enterovirus a las plantas. (Vega et al., 2005; Deboosere et al., 2012). Otra explicación podría ser que las verduras se rocían con la misma agua de riego antes de ser colocadas en el mercado. Existe, entonces, la posibilidad de que la combinación de ambos factores citados anteriormente pudieran estar contribuyendo a una mayor contaminación de las verduras con virus infecciosos.

Los datos cuantitativos sobre partículas virales detectadas en los vegetales de hoja verde permitieron evaluar el riesgo para la salud asociados con la exposición a patógenos transmitidos por los alimentos siendo éste un riesgo alto.

Es importante destacar que, de acuerdo con los resultados informados anteriormente, la tasa de recuperación del virus en el agua y las hortalizas con la concentración y los métodos moleculares utilizados en este estudio se encuentra entre el 5 y el 35% (Prez et al., 2016); por lo tanto, podría ser posible que los resultados del presente documento sean subestimados.

En los últimos años, otros autores han informado la presencia de virus en aguas de riego y vegetales crudos asociados (van Zyl et al., 2006; Cheong et al., 2009). Sin embargo, los artículos publicados informaron limitaciones para establecer el vínculo entre la contaminación viral de las aguas de riego y las muestras de vegetales. Estas limitaciones se refieren a la falta de detección viral concurrente o la falta de secuenciación de cepas virales en el agua de riego y en las muestras de plantas asociadas.

Estudios publicados recientemente informaron la detección de RV en 11/134 (8%) de vegetales congelados en la Ciudad de México (Parada – Fabian et al., 2016), y en 9/63 (14%) agua de riego y 1/61 (1.7%) de las verduras crudas correspondientes en tres regiones del sur de África (van Zyl et al., 2006). Además, un estudio realizado en Corea del Sur, que monitorea la aparición de virus entéricos en muestras de agua subterránea y en las materias primas asociadas, detectó virus entéricos en frecuencias del 17% y 10% respectivamente (Cheong et al., 2009). En ese estudio, el adenovirus fue el virus más frecuentemente detectado en cuatro muestras de agua subterránea y tres vegetales; Se detectaron EV y NoV en una sola muestra de agua subterránea y una espinaca

La amplia gama de virus entéricos informados en los artículos citados anteriormente es similar al que se encuentra en el presente estudio y confirma el papel de los vegetales como vehículos transmisores de virus entéricos.

En base a la concurrencia de la detección de virus entéricos y los perfiles de genotipo identificados en el agua y en las muestras de vegetales asociadas, nuestros resultados permiten suponer que la contaminación viral de los vegetales verdes podría originarse parcialmente durante la fase de producción de la granja a la mesa. No es posible descartar la contaminación posterior a la recolección con virus entéricos, ya que no se realizó ningún trabajo de seguimiento de la fuente.

Estos resultados proporcionan los primeros datos para Argentina señalando que las verduras de hoja verde están contaminadas con una amplia gama de virus entéricos y que el agua de riego sería una fuente de contaminación. La presencia de genomas virales y partículas infecciosas en los alimentos que, en general, no reciben tratamiento antes del consumo, reafirma que los cultivos verdes pueden actuar como fuentes potenciales de transmisión de virus entéricos. Este estudio preliminar ha puesto de relieve la necesidad de seguir la vigilancia profunda de virus entéricos en ambientes acuáticos y el vínculo con la contaminación de hortalizas en Argentina. Se sigue estudiando la posibilidad de

proponer para cultivos un indicador viral de calidad virológica que demuestre la contaminación en verduras de hoja verde

Nuestros hallazgos revelan la necesidad de una intervención pública en el uso de las aguas del río como fuente de riego de vegetales. Esto sería particularmente relevante para reducir el riesgo de virus transmitidos por los alimentos debido al consumo de vegetales de hoja verde.

**El subsidio Roemmers permitió consolidar los resultados obtenidos además de facilitar el desarrollo de las siguientes publicaciones en revistas científicas, congresos y medios de comunicación:**

### **Publicaciones**

1. Farías AA, Mojsiejczuk LN, Flores FS, Aguilar JJ, Prez VE, Masachessi G, Nates SV. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Córdoba City, Argentina: Prevalence and Detection of Serotypes from 2009 to 2014. *Food Environ Virol.* 2019 Jun;11(2):198-203. doi: 10.1007/s12560-019-09379-z.
  2. Aguirre BP, Masachessi G, Ferreyra LJ, Biganzoli P, Grumelli Y, Panero MD, Wassaf MM, Pisano MB, Welter A, Mangeaud A, Ré V, Nates SV, Pavan JV. Searching variables to assess recreational water quality: the presence of infectious human enterovirus and its correlation with the main variables of water pollution by multivariate statistical approach in Córdoba, Argentina. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019 Mar;26(7):6586-6601. doi: 10.1007/s11356-019-04124-2.
  3. Prez VE, Martínez LC, Victoria M, Giordano MO, Masachessi G, Ré VE, Pavan JV, Colina R, Barril PA, Nates SV. Tracking enteric viruses in green vegetables from central Argentina: potential association with viral contamination of irrigation waters. *Sci Total Environ.* 2018 Oct 1;637-638:665-671. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.044.
  4. Masachessi G, Pisano MB, Prez VE, Martínez LC, Michelena JF, Martínez-Wassaf M, Giordano MO, Isa MB, Pavan JV, Welter A, Nates SV, Ré V. Enteric Viruses in Surface Waters from Argentina: Molecular and Viable-Virus Detection. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Feb 14;84(5). pii: e02327-17. doi: 10.1128/AEM.02327-17.
  5. Barril PA, Fumian TM, Prez VE, Gil PI, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Ferreyra LJ, Ré VE, Miagostovich M, Pavan JV, Nates SV. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ Res.* 2015 Apr;138:409-15. doi: 10.1016/j.envres.2015.03.004.
  6. Prez VE, Gil PI, Temprana CF, Cuadrado PR, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Ré VE, Pavan JV, Nates SV, Barril PA. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Sci Total Environ.* 2015 Dec 15;538:220-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.041.
- Farías AA, Mojsiejczuk LN, Pisano MB, Flores FS, Aguilar JJ, Jean AN, Yanes LA, Masachessi G, Prez VE, Isa MB, Campos RH, Ré VE, Nates SV. Environmental Surveillance of Enteroviruses in Central Argentina: First Detection and Evolutionary Analyses of E14. *Food Environ Virol.* 2018 Mar;10(1):121-126. doi: 10.1007/s12560-017-9318-0.



## Congresos

1. Prez, Verónica Emilse; Martínez, Laura Cecilia; Masachessi, Gisela; Giordano, Miguel Oscar; Barril, Patricia Angélica; Nates, Silvia Viviana. Rotavirus and enterovirus: through irrigation waters to green vegetables. 13th International Double-Stranded RNA (dsRNA) virus Symposium Houffalize, Bélgica, 24-28 Septiembre, 2018 Resumen publicado en Abstract book-Pag. 208 ISBN 978 94-6165 258 4.

2. Prez Ve; Giordano Mo; Masachessi G; Martínez Lc; Barril Pa; Nates Sv. Rotavirus y enterovirus: desde las aguas de riego hasta verduras de hoja. XXXVIII Reunión Científica Anual de Virología. Del 5 al 7 de diciembre de 2018. Complejo Vaquerías, Valle Hermoso, Córdoba, Argentina. Publicado en libro de resúmenes [www.aam.org.ar/src/img\\_up/29112018.0.pdf](http://www.aam.org.ar/src/img_up/29112018.0.pdf)

## Capítulos de libros

1. Verónica Prez, Miguel Giordano, Patricia Barril, Gisela Masachessi, Leonardo Ferreyra, María Beatriz Isa, Laura Martínez Y Silvia Nates Capítulo 13 – GASTROENTERITIS VIRALES. Pag 161-70 En el libro: Virología. Un enfoque integral de las infecciones virales humanas Editores Literarios María Pilar Adamo ; Marta Contigiani Instituto de Virología “Dr. JM Vanella” Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. 2018 Editorial Brujas. Primera edición. Número de páginas 423 ISBN 978-987-760-170-1

## Medios audiovisuales

1. Detectan virus en las verduras de un sector del cinturón verde Diario La Voz del Interior 12 de junio de 2018 <http://www.lavoz.com.ar/ciudadanos/detectan-virus-en-las-verduras-de-un-sector-del-cinturon-vede>

### **Programa de Valorización del Conocimiento en la Universidad Nacional de Córdoba.**

1. Detección de virus en aguas superficiales y alimentos. Proyectos marcos: PICT-2012 N°0998 y PICT 2016 N°2165, financiados por FonCyT-Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la Nación. <http://www.unc.edu.ar/investigacion/programas/valorizacion-del-conocimiento/programa-de-valorizacion-del-conocimiento-de-la-unc.>

## Curso de postgrado

**1. Microbiología de aguas y alimentos: implicancias en salud y saneamiento ambiental.** Directoras: Dra. Gisela Masachessi, Dra. Laura Martínez Coordinadora: Lic. Verónica E. Docentes: Dra Viviana Re, Dra Maribel Martínez Wasaff, Dra Silvia Nates.

Objetivos: Acercar conocimientos básicos sobre aspectos relacionados a la problemática de la contaminación microbiológica de aguas superficiales, agua de riego y alimentos y su impacto en la salud de la población expuesta, promoviendo de esta manera la formación técnico-académica de recursos humanos. Plantear acciones de remediación y

saneamiento de aguas y alimentos contaminados a través de la participación interdisciplinaria de grupos de trabajo.

## **Bibliografía**

1. Barril, P.A., Giordano, M.O., Isa, M.B., Masachessi, G., Ferreyra, L.J., Castello, A.A., Glikmann, G., Nates, S.V., 2010. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Cordoba, Argentina. *J. Med. Virol.* 82 (7), 1277–1281.
2. Barril, P.A., Fumian, T.M., Prez, V.E., Gil, P.I., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Isa, M.B., Ferreyra, L.J., Re, V.E., Miagostovich, M., Pavan, J.V., Nates, S.V., 2015. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ. Res.* 138, 409–415.
3. Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4 (4), 413–423.
4. Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A., 2000. Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7), 2759–2763.
5. Blanco Fernandez, M.D., Torres, C., Riviello-Lopez, G., Poma, H.R., Rajal, V.B., Nates, S., Cisterna, D.M., Campos, R.H., Mbayed, V.A., 2012. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (12), E548–551.
6. Blatchley 3rd, E.R., Gong, W.L., Alleman, J.E., Rose, J.B., Huffman, D.E., Otaki, M., Lisle, J.T., 2007. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environ. Res.* 79 (1), 81–92.
7. Bok, K., Castagnaro, N., Borsa, A., Nates, S., Espul, C., Fay, O., Fabri, A., Grinstein, S., Miceli, I., Matson, D.O., Gomez, J.A., 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J. Med. Virol.* 65 (1), 190–198.
8. Boxman, I.L., Tilburg, J.J., Te Loeke, N.A., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E., Koopmans, M., 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 108 (3), 391–396.
9. CDC, 2000. Centers for Disease Control and Prevention – foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students—District of Columbia, March–April 2000. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 49 (50), 1131–1133.
10. Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W.C., Lee, C.H., Kim, S.J., 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (24), 7745–7751.
11. Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I., Mead, P., 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J. Infect. Dis.* 18 (4), 1467–1470.
12. Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S., Temmam, S., Loutreul, J., Morin, T., Estienney, M., Belliot, G., Pothier, P., Gantzer, C., Vialette, M., 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiol.* 32 (1), 48–56.
13. Directorate, C., 2002. Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scf\\_out125\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out125_en.pdf), Accessed date: 20 April 2018.
14. Farías, A.A., Mojsiejczuk, L.N., Pisano, M.B., Flores, F.S., Aguilar, J.J., Jean, A.N., Yanes, L.A., Masachessi, G., Prez, V.E., Isa, M.B., Campos, R.H., Ré, V.E., Nates, S.V., 2018.

Environmental surveillance of enteroviruses in Central Argentina: first detection and evolutionary analyses of E14. *Food Environ. Virol.* 10 (1):121–126.

<https://doi.org/10.1007/s12560-017-9318-0>

15. Fernandez, M.D., Torres, C., Poma, H.R., Riviello–Lopez, G., Martinez, L.C., Cisterna, D.M., Rajal, V.B., Nates, S.V., Mbayed, V.A., 2012. Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio–temporal diffusion processes. *Sci. Total Environ.* 437, 262–269.
16. Ferreyra, L.J., Giordano, M.O., Martinez, L.C., Barril, P.A., Masachessi, G., Isa, M.B., Poma, R., Rajal, V., Biganzoli, P., Nates, S.V., Pavan, J.V., 2015. Tracking novel adenovirus in environmental and human clinical samples: no evidence of endemic human adenovirus type 58 circulation in Cordoba city, Argentina. *Epidemiol. Infect.* 143 (7), 1427–1431.
17. Giordano, M.O., Ferreyra, L.J., Nates, S.V., 2016. Astrovirus Humanos en Aguas Recreacionales de Córdoba, Argentina. *Schaltungsdienst Lange o.H.G., Berlin, Editorial Académica Española.* Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361 (18), 1776–1785.
19. Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28 (2), 276–282.
20. Guevremont, E., Brassard, J., Houde, A., Simard, C., Trottier, Y.L., 2006. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT–PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J. Virol. Methods* 134 (1–2), 130–135.
21. Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Uberla, K., Wilhelm, M., 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely–populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.* 43 (10), 2657–2668.
22. Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R., Menzies, J.D., 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver–stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16 (3), 473–477.
23. Hirneisen, K.A., Kniel, K.E., 2013. Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology* 103 (4), 389–394.
24. Iaconelli, M., Purpari, G., Della Libera, S., Petricca, S., Guercio, A., Ciccaglione, A.R., Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Fratini, M., Muscillo, M., La Rosa, G., 2015. Hepatitis A and E viruses in wastewaters, in river waters, and in bivalve molluscs in Italy. *Food Environ. Virol.* 7 (4), 316–324.
25. INDEC, 2010. Instituto Nacional de Estadística y Censos, Argentina (National Institute of Statistics and Census, Argentina). (Results from census). 2010. <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>.
26. Jones, T.H., Brassard, J., Topp, E., Wilkes, G., Lapen, D.R., 2017. Waterborne viruses and F–specific coliphages in mixed–use watersheds: microbial associations, host specificities, and affinities with environmental/land use factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (3).
27. La Rosa, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2012. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48 (4), 397–406.
28. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685.
29. Lambertini, E., Spencer, S.K., Kieke Jr., B.A., Loge, F.J., Borchardt, M.A., 2011. Virus contamination from operation and maintenance events in small drinking water distribution systems. *J. Water Health* 9 (4), 799–812.
30. Lewis, G.D., Metcalf, T.G., 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (8), 1983–1988.

31. Little, C.L., Gillespie, I.A., 2008. Prepared salads and public health. *J. Appl. Microbiol.* 105 (6), 1729–1743.
32. Martinez Wassaf, M.G., Pisano, M.B., Barril, P.A., Elbarcha, O.C., Pinto, M.A., Mendes de Oliveira, J., DiGiusto, P., Nates, S.V., Re, V.E., 2014. First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: environmental and serological survey. *J. Clin. Virol.* 61 (3), 334–339.
33. Miura, F., Matsuyama, R., Nishiura, H., 2018. Estimating the asymptomatic ratio of norovirus infection during foodborne outbreaks with laboratory testing in Japan. *J. Epidemiol.* <https://doi.org/10.2188/jea.JE20170040> [Epub ahead of print].
34. Mizukoshi, F., Kuroda, M., Tsukagoshi, H., Sekizuka, T., Funatogawa, K., Morita, Y., Noda, M., Katayama, K., Kimura, H., 2014. A food-borne outbreak of gastroenteritis dueto genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol. Immunol.* 58 (9), 536–539.
35. Mok, H.F., Barker, S.F., Hamilton, A.J., 2014. A probabilistic quantitative microbial risk assessment model of norovirus disease burden from wastewater irrigation of vegetables in Shepparton, Australia. *Water Res.* 54, 347–362.
36. Moore, M.D., Goulter, R.M., Jaykus, L.A., 2015. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 411–433.
37. Nadan, S., Walter, J.E., Grabow, W.O., Mitchell, D.K., Taylor, M.B., 2003. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2), 747–753.
38. Pallansch, M.A., Roos, R., 2007. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., et al. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 839–893.
39. Parada-Fabian, J.C., Juarez-Garcia, P., Natividad-Bonifacio, I., Vazquez-Salinas, C., Quinones-Ramirez, E.I., 2016. Identification of enteric viruses in foods from Mexico City. *Food Environ. Virol.* 8 (3), 215–220.
40. Pavione, D.M., Bastos, R.K., Bevilacqua, P.D., 2013. Quantitative microbial risk assessment applied to irrigation of salad crops with waste stabilization pond effluents. *Water Sci. Technol.* 67 (6), 1208–1215.
41. Payment, P., Locas, A., 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49 (1), 4–11.
42. Prez, V.E., Gil, P.I., Temprana, C.F., Cuadrado, P.R., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Isa, M.B., Re, V.E., Pavan, J.V., Nates, S.V., Barril, P.A., 2015. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Cordoba, Argentina. *Sci. Total Environ.* 538, 220–229.
43. Prez, V.E., Martínez, L.C., Masachessi, G., Giordano, M.O., Ré, V.E., Pavan, J.V., Nates, S.V., Barril, P.A., 2016. Evaluation of a virus recovery method for detecting rotavirus on chicory. III Latinamerican Symposium of Environmental Virology – Salta, Argentina (ISBN: 978-987-633-506-5).
44. Pusch, D., Oh, D.Y., Wolf, S., Dumke, R., Schroter-Bobsin, U., Hohne, M., Roske, I., Schreier, E., 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150 (5), 929–947.
45. Ruggeri, F.M., Bonomo, P., Ianiro, G., Battistone, A., Delogu, R., Germinario, C., Chironna, M., Triassi, M., Campagnuolo, R., Cicala, A., Giammanco, G.M., Castiglia, P., Serra, C., Gaggioli, A., Fiore, L., 2015. Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute diarrhea in Italy in 2010 and 2011. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (1), 241–249.
46. Ruiz-Palacios, G.M., Perez-Schael, I., Velazquez, F.R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S.C., Chevart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B.L., Cervantes, Y., Linhares, A.C., Lopez, P., Macias-Parra, M., Ortega-Barria, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D.M., Rivera, L., Salinas, B., Pavia-Ruz, N., Salmeron, J., Ruttimann, R., Tinoco, J.C., Rubio, P.,

- Nunez, E., Guerrero, M.L., Yarzabal, J.P., Damaso, S., Tornieporth, N., Saez-Llorens, X., Vergara, R.F., Vesikari, T., Bouckennooghe, A., Clemens, R., De Vos, B., O'Ryan, M., Human Rotavirus Vaccine Study, G., 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 354 (1), 11–22.
47. Rusinol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratala, A., Abril, J.F., Silvera, C., Figueras, M.J., Gelati, E., Rodo, X., Kay, D., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2015. Evidence of viral dissemination and seasonality in aMediterranean river catchment: implications for water pollution management. *J. Environ. Manag.* 159, 58–67.
48. Sakamoto, T., Negishi, H., Wang, Q.H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., Kaneshi, K., Nakaya, S., Ueda, Y., Sugita, K., Motohiro, T., Nishimura, T., Ushijima, H., 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription–polymerase chain reaction with serotype–specific primers (1 to 8). *J. Med. Virol.* 61 (3), 326–331.
49. Scandura, J.E., Sobsey, M.D., 1997. Viral and bacterial contamination of groundwater from on–site sewage treatment systems. *Water Sci. Technol.* 35 (11–12), 141–146.
50. Schiff, G.M., Stefanovic, G.M., Young, E.C., Sander, D.S., Pennekamp, J.K., Ward, R.L., 1984. Studies of echovirus–12 in volunteers: determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose. *J. Infect. Dis.* 150 (6), 858–866.
51. Van Zyl, W.B., Page, N.A., Grabow, W.O., Steele, A.D., Taylor, M.B., 2006. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (7), 4554–4560.
52. Vega, E., Smith, J., Garland, J., Matos, A., Pillai, S.D., 2005. Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *J. Food Prot.* 68 (10), 2112–2117.
53. Vennema, H., de Bruin, E., Koopmans, M., 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk–like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.* 25 (2), 233–235.
54. WHO, 2004. World Health Organization. Guidelines for Drinking–water Quality. 3th Ed.
55. Yanez, L.A., Lucero, N.S., Barril, P.A., DiazMdel, P., Tenaglia, M.M., Spinsanti, L.I., Nates, S.V., Isa, M.B., Re, V.E., 2014. Evidence of hepatitis A virus circulation in central Argentina: seroprevalence and environmental surveillance. *J. Clin. Virol.* 59 (1), 38–43.

## **Summary**

Consumption of green vegetable products is commonly viewed as a potential risk factor for infection with enteric viruses. The link between vegetable crops and fecally contaminated irrigation water establishes an environmental scenario that can result in a risk to human health. The aim of this work was to analyze the enteric viral quality in leafy green vegetables from Córdoba (Argentina), its potential association with viral contamination of irrigation waters and contribute to the search for reliable viral markers to improve the study of the virological quality of vegetable crops. During July–December 2012, vegetables were collected from peri-urban green farms and its corresponding urban river irrigation waters from Córdoba and Colonia Caroya. Also, urban sewage samples from Córdoba city were collected to analyze the viral variants circulating in the community. Viruses were eluted and concentrated by polyethylene glycol precipitation and then tests with molecular and cellular techniques were performed. Norovirus, rotavirus, astrovirus, picobirnavirus and infective enterovirus were detected in different frequencies. A similar profile in sewage, irrigation water and green vegetables was observed for norovirus distribution as well as for rotavirus and astrovirus. These results provide the first data for Argentina pointing out that green leafy vegetables are contaminated with a broad range of enteric viruses and that the irrigation water would be a source of contamination. The presence of viral genomes and infective particles in food that in general suffer minimal treatment before consumption underlines that green crops can act as potential sources of enteric virus transmission. It is important to continue advancing on the choice of the best viral marker of contamination in green leafy vegetables that best results on the presence of viruses with an impact on health. Public intervention in the use of the river waters as irrigation source is needed.

# ESTUDIO DEL ROL DE LA PROTEÍNA DE ESTRÉS HSP27 Y DEL DAÑO AL ADN COMO MARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A DROGAS ANÁLOGAS DEL PLATINO EN PACIENTES ONCOLÓGICOS

Dra. Silvina Nadin

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Centro Científico Tecnológico (CCT) CONICET MENDOZA

## Resumen

Desde su aprobación por la US FDA en 1979, el cisplatino ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de un amplio espectro de tumores sólidos. Lamentablemente, la aparición de resistencia limita en muchas ocasiones su eficacia. La citotoxicidad de cisplatino es mediada por la generación de uniones cruzadas (aductos) en el ADN. Estos aductos generan distorsiones en la doble hélice que comprometen su funcionalidad, se produce la detención del ciclo celular y la apoptosis. Las causas de resistencia a cisplatino son complejas y multifactoriales y diversas moléculas se han asociado con su aparición, tales como las proteínas de golpe de calor (*Heat Shock Proteins*, HSPs). La proteína Hsp27 (HSPB1) se expresa en bajas proporciones en células normales y diversos estímulos pueden inducir e incrementar su expresión. Además, muchos tumores ya expresan en forma constitutiva elevados niveles de Hsp27. Desde hace varios años nuestro grupo estudia la utilidad de las HSPs como marcadores de respuesta a quimioterapia. Hemos reportado que la sobre-expresión nuclear de HSP27 correlaciona con mayor supervivencia libre de enfermedad y global de pacientes oncológicos tratados con antraciclinas o con análogos del platino. A su vez, en dichos pacientes, también verificamos mayor reparación del ADN. La electroforesis en gel de células individuales, también conocida como “*Comet assay*” permite evaluar el daño al ADN en células individuales. Esta metodología se ha utilizado para analizar el daño al ADN causado por diferentes tipos de agentes, ambientales, quimioterapia, radioterapia, etc. Años atrás nuestro grupo de investigación reportó su utilidad para predecir respuesta a quimioterapia en linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes oncológicos. Otras moléculas que también han sido propuestas como biomarcadores de daño al ADN para estudios translacionales son  $\gamma$ H2AX y 53BP1. En este trabajo nos propusimos determinar en LSP de pacientes oncológicos expuestos *in vitro* a hipertermia y/o cisplatino, la utilidad predictiva y pronóstica del estudio del daño al ADN por medio de *alkaline comet assay* y de HSP27, focos de  $\gamma$ H2AX y 53BP1, por inmunocitoquímica. El tratamiento térmico de tumores, solo o combinado con radioterapia o quimioterapia, es ampliamente aceptado en la clínica oncológica, y se utiliza en diversos países. Se incorporaron al estudio 5 personas sanas y 20 pacientes oncológicos. Los LSP fueron obtenidos por punción venosa antes

del inicio de la quimioterapia y tratados en cultivo solo con cisplatino (cPt) o con hipertermia y cisplatino (H+cPt). Las células fueron recolectados a diferentes tiempos luego de los tratamientos: T0, inmediatamente después del cPt; T24, 24 h después del cPt y T48, 48 h después de cPt. Demostramos que la expresión nuclear de HSP27 se asociaba con respuesta clínica completa y mejor pronóstico de los pacientes. La migración del ADN se incrementó significativamente luego del tratamiento con cPt o H+cPt. Además, una migración del ADN superior a la media se asoció con mayor supervivencia global. Los pacientes no respondedores mostraron menor proporción de focos de  $\gamma$ H2AX y 53BP1, a diferencia de los pacientes con respuesta clínica completa, luego del tratamiento con cPt. Por otra parte, pacientes con niveles de H2AX y 53BP1 superiores a la media (tanto en LSP tratados con cPt como con H+cPt) presentaron mayor supervivencia global. Nuestros resultados demuestran la potencial utilidad de HSP27 y del estudio del daño en el ADN como marcadores predictivos y pronósticos en pacientes oncológicos tratados con cisplatino. En la práctica, el uso de estos marcadores podría anticipar al médico oncólogo la respuesta individual al tratamiento antineoplásico, permitiendo el cambio del esquema terapéutico en los pacientes no respondedores.

## **Abstract**

Cisplatin is an antineoplastic agent widely used for the treatment of solid tumors. Unfortunately, drug resistance limits the effectiveness of the therapy. Cisplatin (cPt) cytotoxicity is mediated by the formation of DNA cross-links (adducts). Cisplatin-DNA adducts cause significant distortions to the double helix compromising DNA function, triggering cell cycle arrest and apoptosis. Molecular mechanisms of cPt resistance are complex and multifactorial. Among the molecules related to cPt-resistance, are the Heat Shock Proteins, HSPs. HSP27 express in all living cells accomplishing chaperones functions, but diverse stimuli increase its expression. In previous studies, we reported that higher nuclear HSP27 levels correlated with longer disease-free survival and overall survival of cisplatin-treated patients. Comet assay is a method to study DNA damage at a single cell level. A few years ago, we reported the potential of the assay to predict chemotherapy response in cancer patients. Here, we determined the expression of HSP27, and the DNA damage/repair-related molecules  $\gamma$ H2AX and 53BP1 by immunocytochemistry, and DNA migration by comet assay in peripheral blood lymphocytes (PBL) from 5 healthy subjects and 20 cancer patients. We correlated the results with clinical response to chemotherapy and outcome of the patients. Because, hyperthermia (H) is used in several countries to potentiate chemo/radiotherapy, were exposed PBL (obtained from venous puncture before chemotherapy) to cPt and H+cPt. Cells were collected at T0 (immediately after cPt), T24 (24 h after cPt) and T48 (48 h after cPt). We observed that nuclear HSP27 expression correlated with clinical complete response (CR) and better outcome. Treatment with cPt or H+cPt significantly increased DNA migration. Also, a DNA migration higher than the mean was associated with longer overall survival (OS). Non-responders patients showed lower proportion of  $\gamma$ H2AX and



53BP1 foci, in contrast to patients with CR. A same behavior was also found after cPt treatment, non-responders patients had lower expression of these markers than responders and healthy subjects. Also, increased levels of H2AX and 53BP1 associated with longer OS (cPt and H+cPt groups). Our results demonstrate the potential utility of HSP27 and DNA damage response molecules as predictive/prognostic markers in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy. The use of these markers could anticipate the individual response to antineoplastic treatment, allowing to change the therapeutic scheme in non-responders patients.

# EVALUACIÓN DE COMPONENTES SÉRICOS EN MIASTENIA GRAVIS COMO POTENCIALES MARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD: AUTOANTICUERPOS Y SISTEMA COMPLEMENTO

Mariela L Paz <sup>1-2</sup>, Daniel González Maglio <sup>1-2</sup>, Florencia Aguirre <sup>3-4</sup>, Andres M Villa <sup>3-4</sup>, Juliana Leoni <sup>2</sup>

Institución: <sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Inmunología, Laboratorio de Inmunología Básica, Aplicada y Patológica (LIBAP). Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), LIBAP. Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Sección de Neuroinmunología y Electrofisiología. División Neurología. Hospital J. M. Ramos Mejía. <sup>4</sup>Instituto Centro Argentino de Neuroinmunología. Facultad de Medicina. UBA

## RESUMEN

### INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La Miastenia Gravis (MG) es una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos. En la mayoría de los casos se identifican anticuerpos dirigidos contra el receptor de acetilcolina (ACRA). Estos anticuerpos IgG1-IgG3 son capaces de activar complemento. La activación de la cascada de complemento y la formación del complejo de ataque de membrana provocan la disminución del número de receptores de acetilcolina y la alteración de la neurotransmisión

A pesar del amplio conocimiento en la fisiopatogenia de MG, no se cuenta a la fecha con biomarcadores de utilidad pronóstica. El objetivo del estudio es identificar potenciales biomarcadores de severidad clínica y riesgo de exacerbación en pacientes con MG.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un trabajo prospectivo de corte transversal, aprobado por el comité de Bioética tanto del Hospital Ramos Mejía como de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se consideró como criterio de inclusión a los pacientes con diagnóstico de MG generalizada, ACRA positivos y mayores de 18 años.

En estos pacientes se determinaron niveles de C3, C4, C5a y ACRA y se analizó la relación entre estos biomarcadores y el estado clínico del paciente de acuerdo a escalas ADL (Activities of Daily Living Scale) y MGC (Myasthenia Gravis Composite).

Se llevó a cabo una extracción de 10 ml de sangre venosa en la Sección de Neuroinmunología y Electrofisiología del Hospital Gral. De Agudos JM Ramos Mejía. Las muestras de sangre fueron separadas, una porción en un tubo seco para obtener suero

y otra porción para obtener plasma en un tubo conteniendo Futhan (BD FUT-175®), el cual es un inhibidor de proteasas y de la activación de las vías clásicas y alternativas de complemento. Sueros y plasmas de individuos sanos fueron utilizados a modo de controles negativos o de indicadores de rangos de concentraciones normales en cada ensayo.

En la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica se realizaron todas las determinaciones y análisis de los resultados. Se utilizaron placas comerciales de inmunodifusión radial (Biocientífica) para la determinación de la concentración de los componentes del sistema de complemento C3 y C4. Se utilizaron reactivos comerciales (Biolegend®) para poner a punto un ELISA para la cuantificación del componente C5a. Una porción del suero de cada paciente se separó y se derivó para la cuantificación de ACRA en un laboratorio de análisis clínicos comercial. La cuantificación se realizó por inmunoprecipitación radiométrica, siendo valores menores a 0,1 nmol/L considerados negativos o normales.

Una vez realizadas las determinaciones, se procedió al estudio para evaluar la existencia de correlación estadísticamente significativa entre los distintos parámetros séricos y la evaluación clínica de la enfermedad.

## RESULTADOS

Se incluyeron 60 pacientes con diagnóstico de Miastenia Gravis ACRA positiva, en 9 pacientes se obtuvieron dos muestras en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad. El 65% fueron mujeres. La media de edad de inicio de la MG fue de 34 años con un rango de 3 a 82 años y la media de edad al momento de la toma de muestra fue de 44 años (rango 20-88 años). La duración media de la enfermedad fue de 9 años (rango 0-36 años). El 26% de los pacientes habían sido timentomizados. Respecto de la situación clínica de los pacientes al momento de la evaluación, 19 pacientes (27,5%) se encontraba cursando una exacerbación de la enfermedad y 50 pacientes (72,5%) estaban en estado basal.

Sobre la totalidad de las muestras se midieron los factores de complemento C3, C4 y los anticuerpos contra el receptor de Acetilcolina (ACRA), C5a fue determinado en 63/69 muestras.

La media de C3 fue de 122 mg/dl, con un rango de 41 a 191 y la media de C4 fue de 24 mg/dl, con un rango de 6,5 a 48. Estos valores se encontraban dentro de parámetros normales en relación a valores de referencia.

La media de C5a fue de 28 ng/ml con un rango de 6,9 a 127. Para este último factor de complemento se utilizó un grupo de controles sanos en el cual la media fue de 27 ng/ml con un rango de 3 a 79, no siendo una diferencia estadísticamente significativa.

Los títulos medios de ACRA fueron de 4,7 nmol/L, con un rango de 0,2 a 12,8.

Los niveles de C3, C4 y C5a fueron relacionados con la severidad clínica de la MG, no encontrándose diferencias significativas entre los niveles de estos componentes en condiciones de exacerbación o estado basal. Cuando se correlacionaron estos factores con las escalas de severidad MGC y ADL, tampoco hallamos diferencias estadísticamente significativas, si bien en el caso de C3 se observó una tendencia a mayor consumo en pacientes con mayor score MGC (p 0,08).

Los títulos medios de ACRA fueron más elevados en el grupo de pacientes cursando exacerbación que en los que se encontraban en estado basal, 5,9 nmol/l vs 4,7 nmol/l, aunque sin alcanzar rango estadísticamente significativo (p=0.06). Cuando la severidad clínica de la MG fue valorada según las escalas clínicas MGC y ADL, se halló una

correlación positiva entre mayor severidad, según puntajes más altos de las escalas y títulos de ACRA más elevados. La escala de ADL con ACRA mostró una correlación de Pearson=0.37 y  $p=0,002$  y en el caso de MGC una correlación de Pearson=0.4 y una  $p=0,001$ .

También analizamos el comportamiento de los valores de C3, C4 y C5a en función del título de ACRA. No se observó una correlación significativa entre los niveles de estos factores del complemento y el título de ACRA. La media de C3 (125,72 mg/dl), C4 (25,4 mg/dl) y C5a (32,39 ng/ml) en pacientes con título de ACRA por encima de la mediana (4,7 nMol/l), no difirieron significativamente de aquellas muestras con título de ACRA debajo de la mediana (C3=119,35 mg/dl; C4 22,76 mg/dl; C5a 25,06 ng/ml).

El análisis de las concentraciones C3, C4, C5a y ACRA en subgrupos de pacientes en función del sexo, la presencia de anomalías tímicas y el antecedente de timectomía, no mostraron variaciones estadísticamente significativas.

Se observó una correlación positiva entre la edad de inicio de la MG y los niveles de C3 y C4, señalando mayor consumo de complemento en pacientes de inicio temprano (C3  $r=0,31$  y  $p=0,009$  y C4  $r=0,25$  y  $p=0,041$ ).

Analizamos también los niveles de los factores del complemento y el título de ACRA discriminando a los pacientes de acuerdo a tratamiento recibido, según se encontraran bajo tratamiento inmunosupresor o no. Observamos que en el grupo de los pacientes inmunosuprimidos, los niveles de ACRA fueron significativamente más elevados que en los pacientes que solo se encontraban en tratamiento sintomático con piridostigmina o sin tratamiento ( $p=0,001$ ).

## DISCUSIÓN

La presencia de un marcador de severidad o actividad clínica de la Miastenia Gravis (MG), que permita tomar decisiones terapéuticas o predecir exacerbaciones de la enfermedad, es necesario en el manejo de pacientes con MG. A la fecha no existe un marcador biológico que cumpla con estas características: los estudios electrofisiológicos o el análisis de la patología tímica, resultan poco útiles como marcadores de severidad.

En el análisis de 69 muestras de pacientes con MG ACRA positiva, nosotros no identificamos diferencias en niveles de C3, C4 y C5a en pacientes cursando exacerbación de MG respecto a los que se hallaban en estado basal, tampoco se identificó una correlación significativa entre las concentraciones de estos factores y la severidad de la MG valorada por escalas MGC y ADL, si bien se observó una tendencia hacia valores más bajos de C3 en pacientes con mayor severidad clínica según escala MGC.

Los niveles de C3 y C4 mostraron una correlación positiva con la edad de inicio de la MG, demostrando que los pacientes con debut más temprano de su enfermedad presentan menores concentraciones de estos componentes, probablemente implicando un mayor consumo en este grupo.

La relación entre el título de ACRA y la severidad clínica de la MG ha sido investigada previamente, con resultados disímiles. Algunos trabajos reportaron títulos más altos de anticuerpos en pacientes con grados más severos de MG, mientras que otros autores, no encontraron relación entre una disminución en el título y la mejoría clínica o viceversa.

En este estudio, nosotros mostramos una asociación entre los niveles de ACRA y la severidad de la MG, demostrando la presencia de títulos más altos de anticuerpos en

pacientes con mayor compromiso de la enfermedad según puntajes más altos en escalas ADL y MGC. Estos datos sugieren que la determinación del título de ACRA podría ser un parámetro útil para monitorear actividad clínica de la enfermedad en pacientes con MG generalizada ACRA positiva. Cuando se consideró el tratamiento recibido por los pacientes al momento de la evaluación, se observó la presencia de títulos más altos de anticuerpos en pacientes inmunosuprimidos, esto probablemente se deba a mayor severidad de la MG en este grupo de pacientes.

## CONCLUSIÓN

Los datos de este estudio revalorizan la utilidad práctica del análisis del título de ACRA, y lo postulan como una herramienta para el seguimiento clínico de los pacientes con MG.

## **ABSTRACT**

Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune disease antibody-mediated. In most cases, antibodies against the acetylcholine receptor (ACRA) are identified. These IgG1-IgG3 antibodies are capable of activating complement cascade. Despite the wide knowledge of the physiopathogenesis of MG, there is no biomarker of prognostic utility to date.

The aim of the study is to identify potential biomarkers of clinical severity and risk of exacerbation in patients with MG.

## **MATERIALS AND METHODS**

A prospective study was performed in patients with positive ACRA MG. In these patients, levels of C3, C4, C5a and ACRA were determined and the relationship between these biomarkers and the clinical status of the patient was analyzed according to ADL (Activities of Daily Living Scale) and MGC (Myasthenia Gravis Composite) scales.

## **RESULTS**

Sixty patients were included, from whom 69 samples were obtained at different times of clinical activity of the MG. A statistically significant positive correlation was found between the ACRA titer and the severity according to the ADL and MGC scales. The concentrations of C3, C4 and C5a did not vary according to the severity of MG nor did they show significant differences between patients undergoing exacerbation or at baseline.

## **CONCLUSION**

The data from this study revalue the practical utility of the ACRA titer analysis, and postulate it as a tool for the clinical follow-up of patients with MG.

# ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCIÓN OSTEOARTICULAR EN PACIENTES CON BRUCELOSIS

Ayelen Ivana Pesce Viglietti, Paula Constanza Arriola Benitez, M. Virginia Gentilini, Guillermo Giambartolomei, M. Victoria Delpino

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-Hospital de Clínicas “José de San Martín”

## INTRODUCCION

La Brucelosis es una zoonosis endémica de distribución mundial que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos y la fauna silvestre (Young 1983, Moral 2013). Es causada por bacterias Gram negativas del género *Brucella* que se comportan como patógenos intracelulares facultativos (Pappas 2006).

La afección osteoarticular es la complicación más común de la brucelosis activa en humanos; llegando a afectar hasta el 85% de los pacientes, siendo la pérdida de hueso una complicación grave de la infección por *Brucella* (Madkour 2001).

Los osteocitos son células residentes permanentes del hueso, constituyen más del 95% de las células en la matriz ósea (Parfitt 1977). Durante un proceso patológico, como la infección por *B. abortus*, la función de estas células puede ser alterada llevando a la destrucción ósea mediante diversos mecanismos como; el aumento en la expresión de MMPs, inducción de osteoclastogénesis y la alteración de la función de los osteocitos.

Aunque los linfocitos B tienen una baja capacidad fagocítica en comparación con las células fagocíticas profesionales (Shibuya 2000) internalizan *B. abortus* facilitando el establecimiento de la infección. Los linfocitos B activados tienen una larga vida útil, y la infección por *B. abortus* activa dichas células. Esto sugiere que los linfocitos B podrían ser un nicho de supervivencia para *Brucella* contribuyendo a la cronicidad de la infección (Goenka 2011).

Los mecanismos involucrados en el daño óseo debido a la infección por *Brucella* aún no se conocen completamente. El daño óseo puede atribuirse a la acción directa de las bacterias o a un proceso inmunopatológico debido a la inflamación desencadenada por la respuesta inmune frente a la infección (Giambartolomei 2017).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo de bacterias:** *B. abortus* S2308 (*B. abortus* WT), su mutante isogénica *B. abortus* virB10 ( $\Delta$ virB10), fueron crecidas en medio tripteína de soja durante toda la noche. La concentración de bacterias fue determinada por recuento de unidades formadoras de colonia (UFC).

**Cultivo celular:** La línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4 utilizada fue cultivada en  $\alpha$ -MEM, 10% de suero fetal bovino (SFB) y suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 U de penicilina/ml y 100  $\mu$ g de estreptomicina/ml.

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue usada como precursor de osteoclastos y la línea celular de macrófagos murinos J774.A1 fue utilizada para obtener sobrenadantes de cultivo infectados. Las células RAW 264.7 fueron cultivadas en  $\alpha$ -MEM, 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina. Las células J774.A1 fueron cultivadas en DMEM con 10% de SFB y suplementado como se describió previamente.

Los linfocitos B se obtuvieron de bazo de ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, usando un kit de aislamiento por selección negativa. La pureza de las células B aisladas se confirmó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-CD19 o anti-B220 y fue alrededor del 80%. La viabilidad de las células fue de hasta un 95%. Las células B fueron cultivadas en RPMI 1640 con 10% de SFB y suplementado como se describió previamente.

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Infección celular:** Las células MLO-Y4 fueron cultivadas a una densidad de  $1,3 \times 10^5$  células/pocillo, las J774.A1 a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo y los linfocitos B se cultivaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/pocillo durante 24 hs, en medio completo sin antibióticos y fueron infectadas con *B. abortus* a las diferentes multiplicidades de infección (MOI, de sus siglas en inglés, *Multiplicity Of Infection*).

**Producción de metaloproteasas:** La actividad gelatinolítica de las MMPs fue evaluada mediante zimografía usando como sustrato gelatina. La identificación de la enzima involucrada (MMP-9 ó MMP-2) se determinó por comparación con un marcador de peso molecular.

**Medición de la concentración de citoquinas:** Las citoquinas murinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL y la quemoquina quimioattractante de queratinocitos (KC) fueron medidas en los sobrenadantes de cultivo de las células infectadas o estimuladas con la bacteria muerta por calor (HKBA) mediante ELISA sándwich, usando anticuerpos monoclonales específicos según las instrucciones del fabricante.

**Evaluación de la muerte celular por apoptosis:** Los osteocitos fueron infectados con *B. abortus* a diferentes MOIs. Luego de 24 hs, el porcentaje de células apoptóticas fue evaluado por tinción con Anexina V-FITC y Ioduro de propidio, el análisis se realizó por citometría de flujo. La apoptosis también fue analizada por microscopía de fluorescencia utilizando la técnica de TUNEL o con el colorante nuclear Hoechst 33342.

**Ensayo de formación de osteoclastos:** Células RAW 264.7 fueron cultivadas en  $\alpha$ -MEM, 10% de SFB, suplementado como se describió previamente y 30 ng/ml de M-CSF recombinante murino por 3 días para inducir la diferenciación de los precursores de osteoclastos. Posteriormente se cultivaron por 7 días en medio completo que contenía 30 ng/ml de M-CSF y 0,2 ml de sobrenadantes de cultivo de osteocitos MLO-Y4 o de células B infectadas con *B. abortus* o sobrenadantes de células B estimuladas con HKBA. Para identificar los osteoclastos, las células se tiñeron para determinar la actividad de la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Las células TRAP-positivas y multinucleadas



(más de tres núcleos) se definieron como osteoclastos y el número se determinó por recuento en microscopio.

En los ensayos de neutralización de TNF- $\alpha$  los sobrenadantes de los osteocitos infectados fueron tratados con 20  $\mu$ g/ml de anticuerpo neutralizante anti-TNF- $\alpha$  o su control de isotipo. Los ensayos de neutralización de RANKL se realizaron utilizando el antagonista natural de RANKL, osteoprotegerina (OPG).

**Análisis de la expresión de Cx43 por inmunofluorescencia:** Las células fueron incubadas con anticuerpo anti-Cx43 de ratón y luego se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Alexa 488. La tinción nuclear se realizó con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

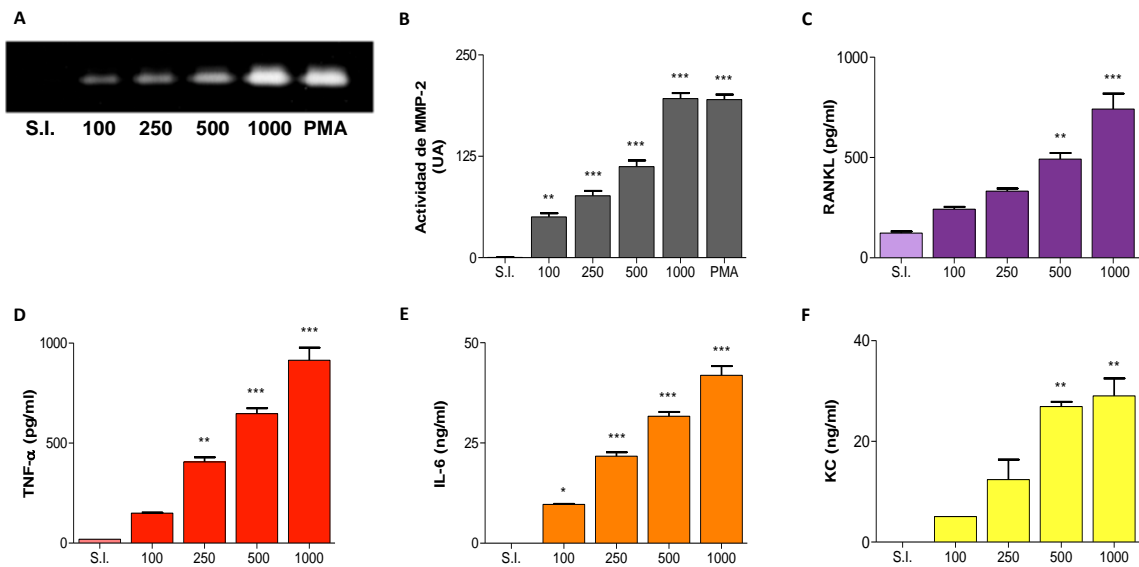
**Obtención de ARN mensajero (ARNm) y RT-qPCR:** El ARN de las células infectadas o estimuladas con sobrenadantes de macrófagos infectados se extrajo utilizando el kit Quick-RNA MiniPrep Kit, 1  $\mu$ g de ARN se sometió a transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa inversa Improm-II. El análisis de PCR se realizó con un sistema de detección de PCR en tiempo real Mx3000P (Stratagene) usando SYBR green como colorante fluorescente de unión al ADN.

**Expresión de RANKL en linfocitos B:** Los linfocitos B infectados con *B. abortus* fueron incubados con anticuerpo anti-RANKL de ratón unido a ficoeritrina (PE) o el control de isotipo. A continuación, las células se analizaron con un citómetro de flujo FACScan usando el software CellQuest.

## RESULTADOS

### **La infección con *B. abortus* induce la secreción de MMP-2, RANKL, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas en osteocitos murinos**

Muchos mediadores moleculares solubles como MMPs, RANKL y/o citoquinas han demostrado ser importantes en la inducción de la osteoclastogénesis en condiciones patológicas (Fronzes 2009). Como se muestra en la **Figura 1** la infección con *B. abortus* indujo un aumento significativo en la expresión de MMP-2 y en la expresión de RANKL, TNF- $\alpha$  e IL-6 de una manera dependiente de la MOI utilizada (**Figura 1A-E**). La secreción de la quemoquina KC también fue inducida por la infección (**Figura 1F**). Estos resultados indican que *B. abortus* puede infectar y multiplicarse en los osteocitos induciendo la secreción de los diferentes mediadores proinflamatorios y proosteoclastogénicos.

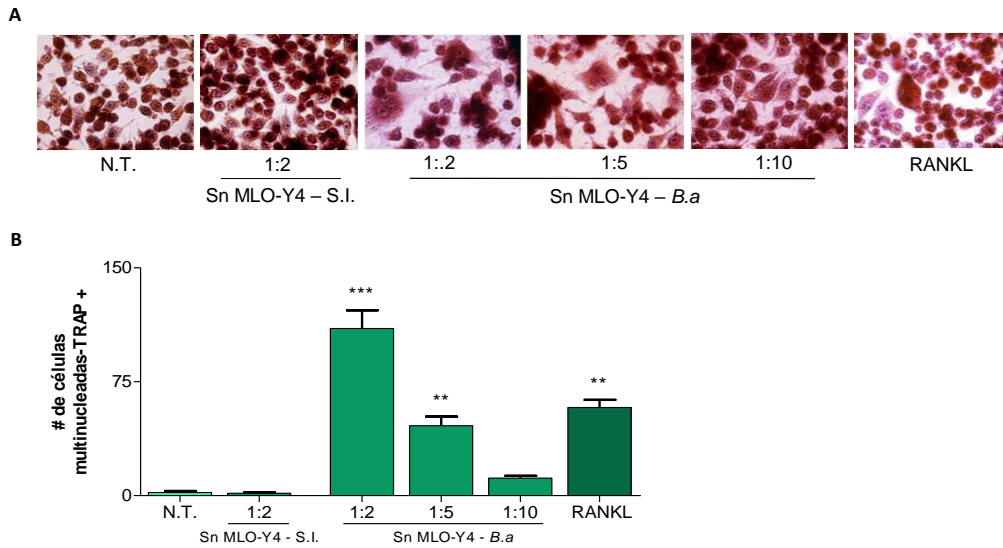


**Figura 1. La infección con *B. abortus* induce la secreción de MMP-2, RANKL, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas en osteocitos murinos.** Las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* a diferentes MOI, a las 24 hs post-infección se determinó la actividad de MMP-2 por zimografía (A) Análisis densitométrico de tres experimentos independientes realizados como se describe para A. (B) Los niveles de RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-6 y KC fueron evaluados por ELISA en sobrenadantes de cultivo recolectados a las 24 hs (RANKL, L-6 y KC) o a las 8 hs (TNF- $\alpha$ ) (C, D, E, F). UA: unidades arbitrarias. PMA: control positivo. \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$  versus el control sin infectar (S.I.).

## Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis

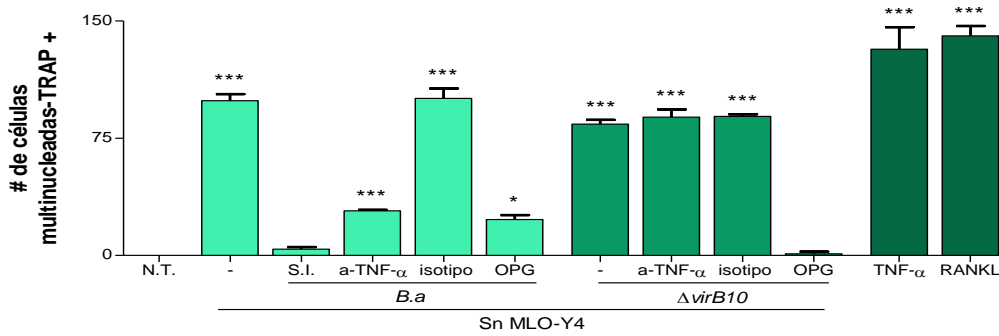
Los osteoclastos son las células encargadas de la degradación de la matriz ósea. Estas células se originan a partir de la fusión de células precursoras que pertenecen al linaje monocitos/macrófagos (Scheven 1986). Este proceso está mediado por RANKL, pero bajo condiciones inflamatorias podría ser mediado por citoquinas proinflamatorias (Fronzes 2009). Evaluamos si los factores producidos por los osteocitos infectados con *B. abortus* podrían inducir la formación de osteoclastos.

Los precursores de osteoclastos estimulados con los sobrenadantes de osteocitos infectados con *B. abortus*, en presencia de M-CSF, se diferencian a osteoclastos maduros (células multinucleadas TRAP positivas) de manera dosis dependiente (Figura 2A, B). Estos resultados indican que los mediadores presentes en el sobrenadante de los osteocitos infectados promueven la formación de osteoclastos.



**Figura 2. Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis.** Los precursores de osteoclastos (RAW 264.7) fueron estimulados con sobrenadantes de cultivo de células MLO-Y4 infectadas con *B. abortus* (*B.a*) (en proporción 1:2, 1:5 ó 1:10) o con sobrenadantes de cultivo (en proporción 1:2) de células MLO-Y4 sin infectar (S.I.) junto con M-CSF (30 ng/ml). Después de 7 días, la osteoclastogénesis se determinó mediante la cuantificación de células multinucleadas, TRAP positivas. Se tomaron imágenes digitales representativas por microscopía óptica (**A**), y se identificaron y contaron células multinucleadas TRAP positivas (**B**). RANKL se utilizó como control positivo (50 ng/ml). N.T.: No tratado. \*\*=  $p < 0.01$ ; \*\*\*=  $p < 0.001$  versus el sobrenadante S.I.

Las citoquinas RANKL y TNF- $\alpha$  son potentes inductores de osteoclastogénesis (Zhang 2011). En comparación con las células no tratadas, la neutralización con el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  redujo significativamente la osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *Brucella*. Además, OPG también redujo significativamente la formación de osteoclastos con respecto a los osteocitos infectados no tratados (**Figura 3**). Estos resultados, indican que las citoquinas RANKL y TNF- $\alpha$  secretadas por los osteocitos infectados son las involucradas en la inducción de osteoclastogénesis.

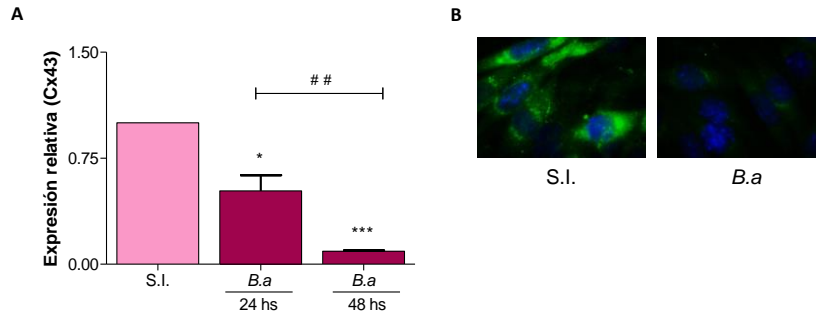


**Figura 3. Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* o la mutante  $\Delta virB10$  inducen osteoclastogénesis a través de RANKL y TNF- $\alpha$ .** Los precursores de osteoclastos fueron estimulados con sobrenadantes de cultivo (en proporción 1:2) de células MLO-Y4 infectadas con *B. abortus* (*B.a*) con sobrenadantes de cultivo de células MLO-Y4 infectadas con la mutante  $\Delta virB10$  o sobrenadantes de células MLO-Y4 sin infectar (S.I.) junto con M-CSF. Los sobrenadantes de las células MLO-Y4 infectadas se pre-incubaron con OPG, un anticuerpo específico neutralizante anti-TNF- $\alpha$ , o el control de isotipo. Luego de 7 días, la osteoclastogénesis se determinó mediante la cuantificación de células multinucleadas, TRAP positivas. RANKL (50ng/ml) y TNF- $\alpha$  (50ng/ml) se utilizaron como control positivo. N.T.: No tratado. \*= p<0.05; \*\*\*= p<0.001 versus el sobrenadante S.I.

### La infección con *B. abortus* redujo la expresión de Cx43

Los osteocitos se conectan con los osteoblastos y con los osteocitos vecinos a través de conexones, Cx43 es la proteína que se encuentra formando los conexones los cuales facilitan el pasaje de factores involucrados principalmente en la sobrevivencia celular (Bivi 2012).

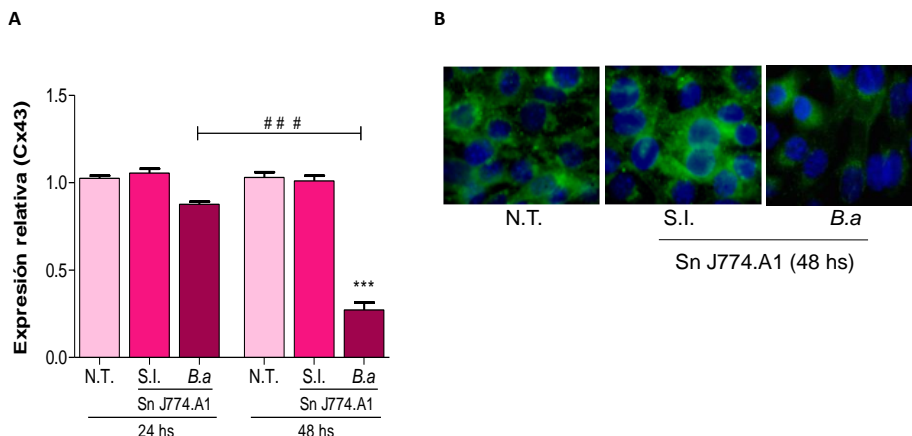
Para determinar si la infección modula la expresión de Cx43 en los osteocitos, las células se infectaron con *B. abortus* y se determinó la expresión del gen de Cx43 a nivel de ARNm por RT-qPCR, y la expresión de la proteína Cx43 se evaluó por inmunofluorescencia. La infección con *B. abortus* redujo la expresión tanto del ARNm como de la proteína de Cx43 (**Figuras 4A, B**), indicando que la infección podría alterar la unión de los osteocitos.



**Figura 4. La infección con *B. abortus* redujo la expresión de Cx43.** La expresión relativa del gen de Cx43 se evaluó mediante la técnica de RT-qPCR en células MLO-Y4 sin infectar (S.I.) o infectadas con *B. abortus* (*B.a*) a las 24 o 48 hs post-infección (**A**). La expresión de la proteína Cx43 se evaluó a las 48 hs post-infección por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos (**B**). \* = $p < 0.05$ ; \*\*\* = $p < 0.001$  versus el control sin infectar (S.I.).

### Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inhiben la expresión de Cx43

Los macrófagos constituyen el principal nicho replicativo de *Brucella*. Estos al ser infectados por *B. abortus* secretan citoquinas proinflamatorias (Comerci 2001) las cuales pueden tener diferentes efectos sobre la expresión de Cx43. Estudiamos entonces, que ocurre con la expresión de Cx43 en los osteocitos frente al estímulo con sobrenadantes de macrófagos murinos infectados. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados inhibieron la expresión de Cx43 a nivel de ARNm y de proteína (**Figura 5E, F**). Estos resultados sugieren que los mediadores secretados por los macrófagos infectados por *B. abortus* podrían alterar la homeostasis ósea modulando la expresión de Cx43 en osteocitos.



**Figura 5. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inhiben la expresión de Cx43.** Las células MLO-Y4 fueron estimuladas con sobrenadantes de macrófagos murinos (J774.A1) sin infectar (S.I.) o infectados con *B. abortus* (*B.a*) en proporción 1:2. Los niveles de expresión relativa del gen de Cx43 (**A**) fue evaluado por RT-qPCR a las 24 y 48 hs luego del estímulo. La producción de Cx43 se evaluó a las 48 hs luego de la estimulación por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos anti-Cx43 (Cx43) los núcleos fueron teñidos con (DAPI) (núcleos) (**B**). \*\* = $p < 0.01$ ; \*\*\* = $p < 0.001$  versus el control no tratado (N.T.).

## CONCLUSIONES

En conjunto estos resultados indican que *B. abortus* crea un microambiente proinflamatorio y proosteoclastogenico el cual contribuye a la destrucción ósea y articular observada en pacientes con brucelosis que presentan complicaciones osteoarticulares, mediante la modificación de la función y la viabilidad de los osteocitos directa e indirectamente, activando la vía autofágica la cual se encuentra involucrada en la deposición de matriz mineral y orgánica por parte de los osteoblastos en el microambiente inflamatorio generado por la bacteria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Young, E.J., *Human brucellosis*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(5): p. 821-42.
- Moral, M., *Diagnóstico de brucelosis: Guía para el equipo de salud N°12, D.d.E.-M.d.S.d.l.N. Argentina, Editor. 2013: Buenos Aires. 2013.*
- Pappas, G., et al., *The new global map of human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(2): p. 91-9.
- Madkour, M.M., *Madkour's Brucellosis. Brucellosis: Overview. (2° Edition)*. 2001, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Parfitt, A.M., *The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption—bone flow theory*. Clin Orthop Relat Res, 1977(127): p. 236-47.
- Shibuya, A., et al., *Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 441-6.
- Goenka, R., et al., *B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus*. J Infect Dis, 2011. **203**(8): p. 1136-46.
- Giambartolomei, G.H., P.C. Arriola Benitez, and M.V. Delpino, *Brucella and Osteoarticular Cell Activation: Partners in Crime*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 256.
- Scheven, B.A., J.W. Visser, and P.J. Nijweide, *In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population*. Nature, 1986. **321**(6065): p. 79-81.
- Fronzes, R., et al., *Structure of a type IV secretion system core complex*. Science, 2009. **323**(5911): p. 266-8.
- Zhang, Y., et al., *Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23516.
- Bivi, N., et al., *Deletion of Cx43 from osteocytes results in defective bone material properties but does not decrease extrinsic strength in cortical bone*. Calcif Tissue Int, 2012. **91**(3): p. 215-24.
- Comerci, D.J., et al., *Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole*. Cell Microbiol, 2001. **3**(3): p. 159-68.

## ABSTRACT

Osteoarticular brucellosis is the most common site of active disease in man. However, the immunomolecular mechanisms involved have not been fully elucidated yet.

The results obtained in this thesis indicate that *B. abortus* invades and replicates in the osteocytes of the murine line (MLO-Y4) inhibiting the expression of connexin-43, without affecting its viability and inducing the secretion of proinflammatory mediators, among which RANKL and TNF- $\alpha$  were the main ones involved in the induction of osteoclastogenesis. The response of the osteocytes could be modulated by infected macrophages, which reduced the expression of connexin-43 and induced the death of osteocytes by apoptosis.

*B. abortus* invades but does not multiply in B lymphocytes, indicating that they constitute a niche of persistence of the bacterium. Our results demonstrated that B lymphocytes are involved in bone damage by inducing osteoclastogenesis through a mechanism involving RANKL.

Overall, these results indicate that *B. abortus* creates a proinflammatory and pro-osteoclastogenic microenvironment which could contribute to the bone and joint destruction observed in patients with osteoarticular complications of brucellosis.

# EXPLORANDO ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE HEPATITIS B EN CÓRDOBA, DESDE LA INTRODUCCIÓN DE LA VACUNA EN POBLACIÓN GENERAL (2012)

Viviana Ré, Gonzalo Castro, María Belén Pisano, María Gabriela Barbás

Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” - Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba. Laboratorio Central, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba.

## Resumen

**Introducción:** El análisis genómico del virus de la hepatitis B (HBV) identifica variantes genotípicas que pueden conducir a comportamientos biológicos y clínicos diferentes. Además, dicho análisis ha demostrado que existen mutantes en la población viral total, incluso antes del inicio de la terapia antiviral, que pueden influir en el diagnóstico, la respuesta a la vacuna y a los tratamientos antivirales.

**Objetivo:** Caracterizar genéticamente al HBV y detectar variantes asociadas a resistencia a antivirales en la provincia de Córdoba, Argentina.

**Métodos:** se analizaron 217 muestras de pacientes mono infectados con HBV (68 agudos y 82 crónicos) y coinfectados HBV/HIV (11 agudos y 56 crónicos) mediante secuenciación de una región del gen S y del promotor basal core y precore (BCP-pC).

**Resultados:** La distribución de subgenotipos (sgt) fue: en pacientes agudos HBV: F1b (72,0%), A2 (13,2%), F4 (7,3%), F (3,0%), C (3,0%), A1 (1,5%) y agudos HBV/HIV: F1b (72,7%), A2 (18,2%), F4 (9,1%). En pacientes crónicos HBV: F1b (32,9%), F4 (22,0%), A2 (14,6%), D (13,4%), F6 (3,7%), C (2,4%). Los sgt A1, A3 y B3 se observaron en el 1,2% de los casos. En pacientes crónicos HBV/HIV: F1b (46,4%), A2 (35,7%), F4 (10,7%), C (5,4%), D (1,8%) (Fig. 1 y 2). El estudio detallado de las secuencias mostró la presencia de 17 secuencias mutantes de relevancia clínica en la región codificante S, asociadas con fallas en el diagnóstico, hepatitis B oculta y/o variantes de escape y 6 secuencias mutantes asociadas a resistencia a antivirales.

Detalladamente, se analizó la presencia de mutaciones en tres regiones diferentes del genoma de HBV: ORF-S, ORF-P y ORF-pC/C en pacientes con hepatitis B y crónica. Globalmente, tanto en pacientes con infección aguda y crónica, mono y coinfectados, en el ORF-S se detectaron mutantes asociadas con falla en el diagnóstico, variantes de escape que evaden la vacuna o el tratamiento con inmunoglobulina. Además, para el ORF-P se hallaron mutantes asociadas a resistencia a LMV, Telbivudina (LdT) y ETV principalmente en pacientes coinfectados HBV/HIV bajo tratamiento.

Entre los individuos con infección aguda por HBV, mono y coinfectados, las mutaciones en la región pC/C, asociadas con niveles más bajos de expresión de HBeAg, fueron casi exclusivamente encontradas en pacientes infectados con cepas sgt F1b aunque las mismas también fueron encontradas en cepas del gt C. Dentro de este grupo de pacientes, el 10,1%



tenía la doble mutación del core A1762 T/G1764A y el 6,3% la mutación precore G1896A, observándose principalmente en los pacientes mono infectados.

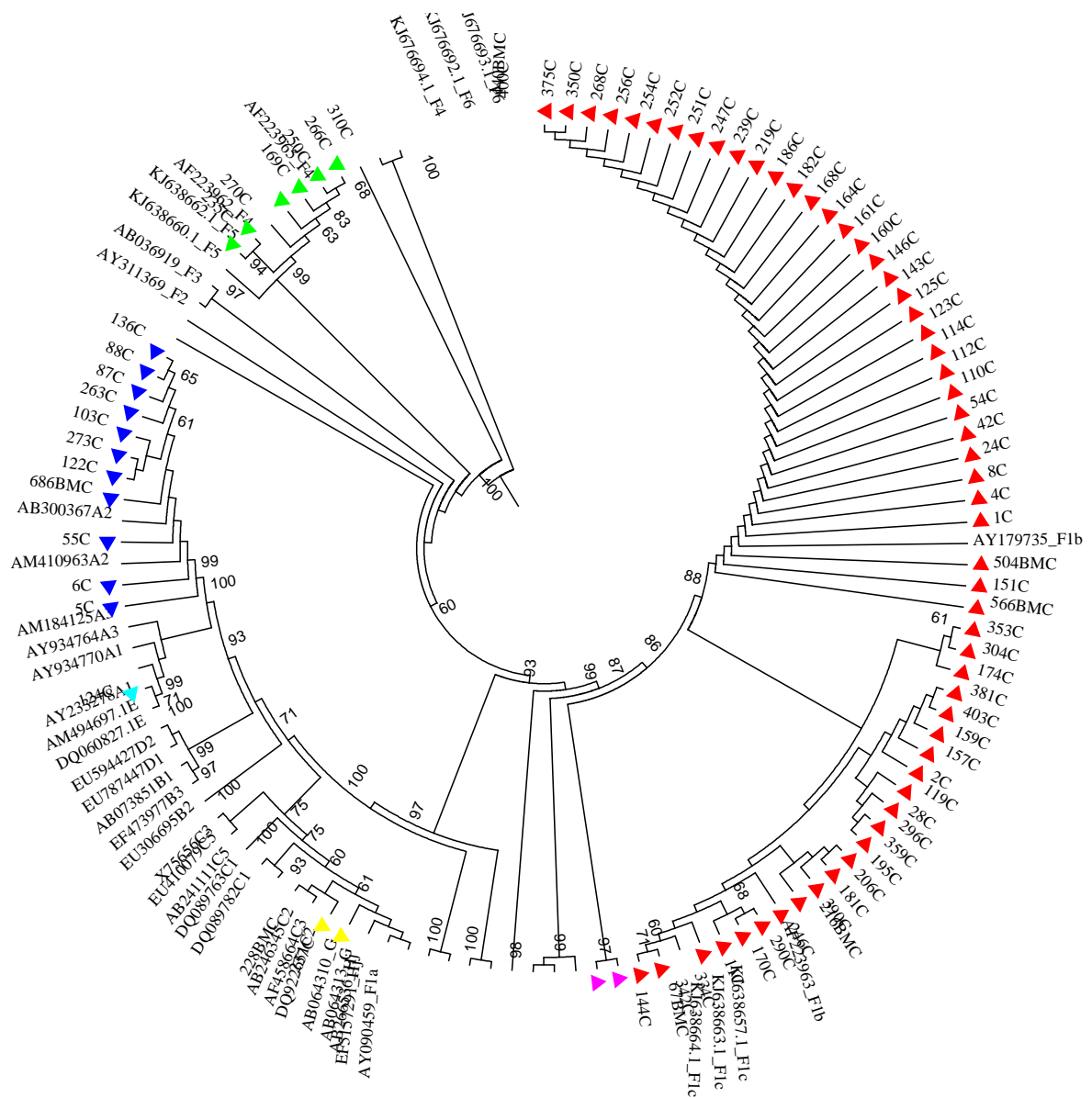
En el caso de los individuos infectados crónicamente, las mutaciones en el ORF-pC/C se describieron principalmente en pacientes mono infectados, sgt A2 y gt C, D y F. El 20,3% tenía la mutación precore G1896A, el 15,2% la doble mutación del core A1762 T/G1764A y la combinación de las tres mutaciones se detectó en el 5,8 % de los pacientes. En relación a las mutaciones en la región hidrofílica mayor (MHR) del ORF-S que generan variantes asociadas con falla en el diagnóstico, variantes de escape que evaden la vacuna o el tratamiento con inmunoglobulina, las mismas se detectaron en pacientes con infección aguda y crónica, mono y coinfectados.

En la cohorte de pacientes estudiados también se detectaron sustituciones de aminoácidos asociadas con resistencia a la terapia antiviral en el ORF-P. Se detectó la mutación rtL180M, causa de posible resistencia a LMV y LdT, en un paciente con infección aguda y las combinaciones rtV173L + rtL180M + rtM204V, causa de resistencia a LMV y LdT y resistencia intermedia a ETV; rtL180M + rtM204V, causa de resistencia a LMV y LdT y L181S, causa de resistencia a Adefovir (ADV), en pacientes con co-infección crónica HBV/HIV. Además, en un paciente con infección crónica por HBV, mono infectado, se detectó la mutación compensatoria a LMV, V173L. El resto de los pacientes pertenecientes a este grupo no presentaron mutaciones en el ORF-P.

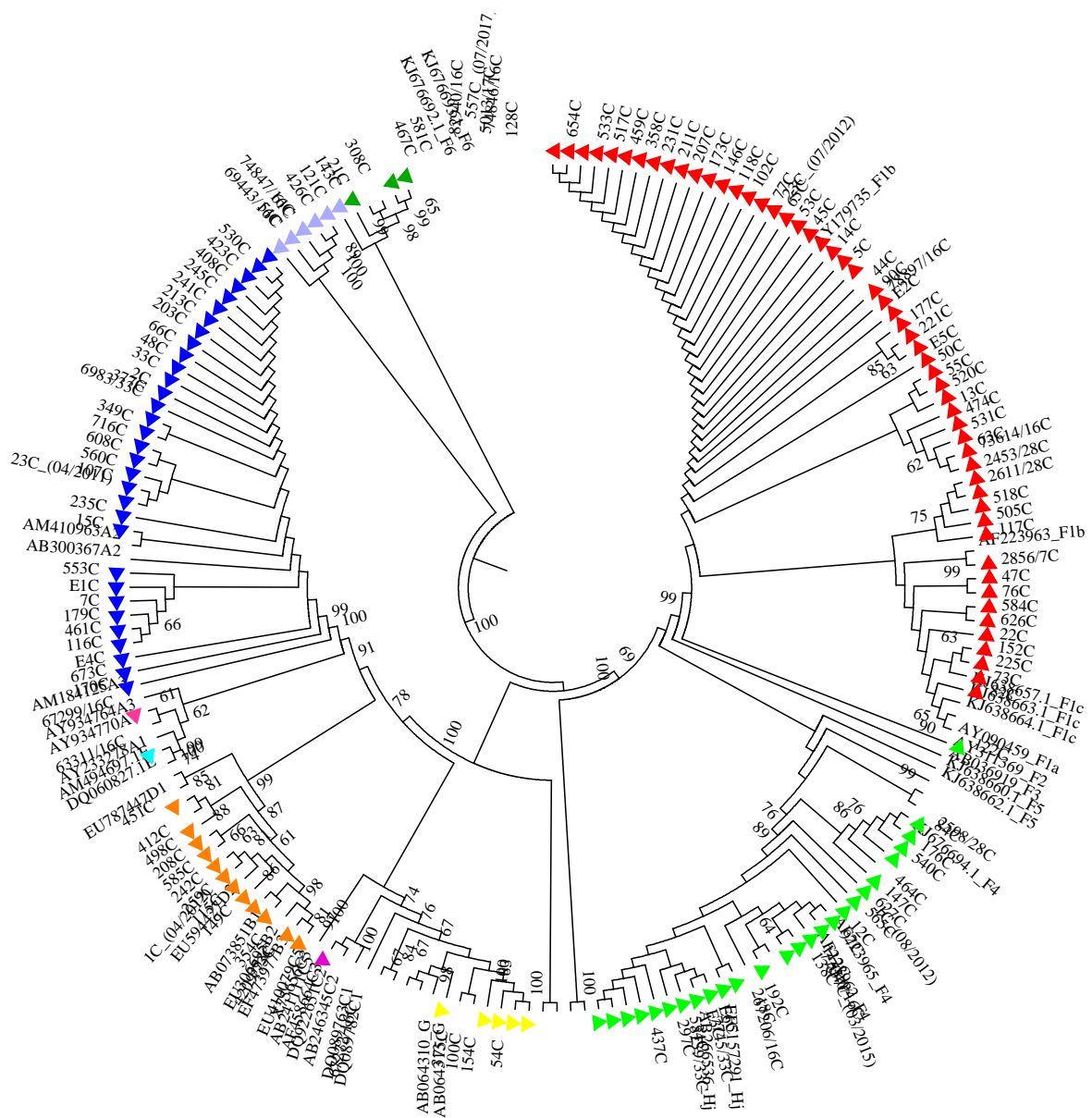
Los pacientes con infección aguda por HBV eran *naive* de tratamiento. En el caso de los pacientes con infección crónica, en el grupo de pacientes mono infectados el 11,0% se encontraban bajo tratamiento, el 64,6% sin tratamiento y en el 24,4% restante no se dispuso de este dato. Para el grupo de pacientes coinfectados HBV/HIV los porcentajes correspondientes fueron 48,2%, 30,4% y 21,4%, respectivamente.

**Conclusiones:** El estudio muestra evidencias actuales de la alta circulación de sgt F1b en pacientes adultos, lo cual posee implicancias clínico epidemiológicas relevantes debido a su menor capacidad de seroconversión y por tanto su potencial capacidad de provocar casos crónicos adversos. El hallazgo de cepas mutantes plantea la necesidad de una vigilancia temporal planificada a fin de detectar precozmente la aparición de nuevas variantes.

**Palabras clave:** Hepatitis B, Genotipos, Epidemiología, Mutaciones precore/core, Argentina.



**Fig. 1. Filogenia de máxima verosimilitud de muestras agudas de HBV de Córdoba, Argentina.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido utilizando una secuencia de 1169 nucleótidos, resultante de concatenar una región del gen S (471 nucleótidos) y una región del gen X / BCP-pC (698 nucleótidos) de muestras de pacientes con hepatitis B aguda y secuencias de referencia de cada genotipo o sub-genotipo disponibles en GenBank. Los números en cada nodo corresponden a los valores de bootstrap obtenidos en 1000 réplicas. **Referencias:** Celeste: A1; Azul: A2; Amarillo: C; Fucsia: F; Rojo: F1b; Verde: F4.



**Fig. 2. Filogenia de máxima verosimilitud de muestras crónicas de HBV de Córdoba, Argentina.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido utilizando una secuencia de 1169 nucleótidos, resultante de concatenar una región del gen S (471 nucleótidos) y una región del gen X / BCP-pC (698 nucleótidos) de muestras de pacientes con hepatitis B crónica y secuencias de referencia de cada genotipo o sub-genotipo disponibles en GenBank. Los números en cada nodo corresponden a los valores de bootstrap obtenidos en 1000 réplicas. **Referencias:** Celeste: A1; Azul: A2; Fucsia: A3; Violeta: B; Amarillo: C; Anaranjado: D; Rojo: F1b; Verde claro: F4; Verde oscuro: F6; Lavanda: sin sub-tipificar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Genomic analysis of hepatitis B virus (HBV) identifies genotypic variants that can lead to different biological and clinical behaviors. In addition, this analysis has shown that there are mutants in the total viral population, even before starting antiviral therapy that can influence the diagnosis, the response to vaccine and antiviral treatments. **Objective:** To genetically characterize HBV and detect drug resistance associated variants in the province of Córdoba, Argentina.

**Methods:** 217 samples from HBV-monoinfected patients (68 acute and 82 chronic) and HBV-HIV-coinfected (11 acute and 56 chronic), were analyzed by sequencing of a region of S gene and a region of basal core promotor and precore (BCP-pC) to determine genotype and subtype and to detect mutants.

**Results:** Phylogenetic analysis resulted in the following distribution of subgenotypes (sgt): in acute-HBV patients: F1b (72.0%), A2 (13.2%), F4 (7.3%), F (3.0%), C (3.0%), A1 (1.5%) and acute-HBV-HIV: F1b (72.7%), A2 (18.2%), F4 (9.1%). In chronic-HBV patients: F1b (32.9%), F4 (22.0%), A2 (14.6%), D (13.4%), F6 (3.7%), C (2.4%). The sgt A1, A3 and B3 were observed in 1.2% of cases. In chronic-HBV-HIV patients: F1b (46.4%), A2 (35.7%), F4 (10.7%), C (5.4%), D (1.8%). Detailed study of sequences showed that there were 17 mutant sequences of clinical relevance in coding region S, associated with faulty diagnosis, hidden hepatitis B and / or escape variants and 6 mutant sequences associated with drug resistance. **Conclusions:** The study shows current evidence of the high circulation of sgt F1b in adult patients, which has relevant clinical and epidemiological implications due to its seroconversion lower capacity and therefore its potential capacity to cause chronic adverse cases. The finding of mutant strains raises the need for a planned temporary surveillance in order to detect early appearance of new variants.

# ESTRONGILOIDOSIS EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS: HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Silvia Repetto, Catalina Dirney Alba Soto, Paula Ruybal, Marikena Risso,  
Mariela Sierra, Estela Batalla, Martin Bravo

Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM). Universidad de  
Buenos Aires - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas

## INTRODUCCION

La estrongiloidosis es una enfermedad crónica, desatendida, cuyas formas severas provocan hasta 80% de mortalidad [OPS-OMS, 2015]. Dichas formas se presentan como resultado del subdiagnóstico de la parasitosis, debido a la falta de técnicas de adecuada sensibilidad que permitan una rápida toma de decisiones en la práctica médica diaria.

Por otra parte, la cura parasitológica se define actualmente como la ausencia de larvas en materia fecal 1 a 2 años post-tratamiento. Sin embargo, la falta de evidencia de acción de las drogas sobre las larvas autoinfectantes y la fluctuación de la excreción larvaria dificultan la confirmación de la erradicación parasitaria. En consecuencia, un estudio parasitológico negativo no debe interpretarse como ausencia de infección [Siddiqui A y Berk S, 2001].

La droga de elección para tratar la infección es la ivermectina [Satoh M y col., 2004]. Si bien otros autores plantean su alta eficacia para el tratamiento de la parasitosis [Buonfrate y col., 2019], hemos obtenido en nuestro laboratorio evidencias acerca de la reactivación de infecciones en pacientes tratados que han realizado controles periódicos por tiempos prolongados [Repetto y col., 2018].

El uso de herramientas moleculares para seguimiento de pacientes tratados permitirá detectar reactivaciones tempranamente, evitando el desarrollo de la infección severa.

## OBJETIVO

Desarrollar y estandarizar un método de diagnóstico molecular, Real-Time PCR (q-PCR), que permita el diagnóstico y seguimiento de la infección por *S. stercoralis* mediante la cuantificación de la carga parasitaria en pacientes con antecedentes de área endémica pasada, sin riesgo actual de infección exógena.

## METODOLOGIA Y RESULTADOS

1. Estandarización de la técnica de PCR cuantitativa para diagnóstico de estrongiloidosis
  - Extracción de ADN de muestras de materia fecal: La extracción de ADN se realizó por método combinado desarrollado en nuestro laboratorio [Repetto y col., 2013, 2016].
  - Cebadores: Se utilizaron los diseñados a partir de la secuencia nucleotídica del gen 18S rRNA del parásito (nro. de acceso en GenBank AF279916.2), específicos de la especie *S. stercoralis* [Verweij y col., 2009].
  - Control interno de la reacción: Se contaminaron muestras de materia fecal de voluntario sano previamente a la extracción de ADN con  $1 \times 10^4$  epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de cultivos. A partir del ADN extraído se amplificó una región de ADN de microsatélites según lo descrito por Moser y col. (1989).
  - Controles de la PCR cuantitativa (qPCR): se extrajo ADN a partir de los materiales mencionados a continuación. Control positivo: se contaminó 1g de materia fecal de voluntario sano con 200 larvas de *S. stercoralis*. Controles negativos: a) Materia fecal de personas sanas. b) Materia fecal de pacientes con otras patologías, fundamentalmente

parasitosis intestinales coendémicas. c) Agua bidestilada. d) Control interno de la reacción. - Curva estándar: Se estandarizó una curva de calibración utilizando 5 diluciones seriadas en factor 2 de ADN obtenido por el método de extracción mencionado (Repetto y col., 2013, 2016) a partir de 1g de materia fecal de voluntario sano con

50 larvas de *S. stercoralis*. Cada dilución conformó un punto de la curva y se ensayó por triplicado, al igual que los controles y muestras de pacientes a cuantificar [Repetto y col., 2010].

-Condiciones de la qPCR: En un volumen final de reacción de 20 µl se utilizaron 4µl de la mezcla comercial EvaGreen® (Solis Biodyne), 7.2 µl de agua bidestilada, 5 µl de ADN y los siguientes reactivos en las concentraciones listadas: cebadores 250 nM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM y BSA 0.1µg/µl. Condiciones de ciclado: 95°C 15 min y 40 ciclos de 95°C 15 seg, 55°C 20 seg y 72°C 32 seg. Se utilizó el equipo para real-time PCR Applied Biosystems 7500. Los resultados fueron analizados mediante Real-Time PCR System Software 7500.

Se construyó una curva estándar a partir de la amplificación de las diluciones seriadas al medio de ADN extraído de materia fecal contaminada con un número conocido de larvas. A partir de esa curva se calculó la eficiencia de la reacción, que fue de 97%, y se obtuvieron por interpolación las concentraciones de ADN de las diferentes muestras clínicas que permitieron conocer la carga parasitaria de cada paciente en el momento de la recolección de la muestra. La media de Ct de las muestras positivas fue de 32,54 (rango 28,2-36,24).

La temperatura de disociación fue de (83,5 ± 1) °C, compatible con el producto de amplificación esperado. El límite de detección de la técnica (sensibilidad analítica) fue 0,001 larvas/gramo de materia fecal.

## 2. Evaluación de la performance de la qPCR para diagnóstico.

Se evaluó a 98 pacientes mayores de 18 años con antecedentes de área endémica para *S. stercoralis*, sin riesgo de reinfección exógena. Con una muestra de materia fecal fresca se realizó parasitológico en fresco, cultivo en agar nutritivo (CAN), PCR de punto final cualitativa (cPCR) y qPCR.

Se consideró como prueba de referencia para comparación de la eficacia las técnicas moleculares la visualización microscópica de larvas.

Se observaron larvas de *S. stercoralis* en el CAN en 28 de 98 pacientes. La cPCR fue positiva en 63 de 98 pacientes, observándose en geles de agarosa un producto de amplificación del tamaño esperado (101 pb). Setenta y cuatro muestras fueron positivas mediante qPCR. El rango de Ct fue de 28.23-36,24 (mediana 32,54).

Sólo una muestra fue negativa por qPCR pero positiva por CAN y cPCR. La sensibilidad de la qPCR fue de 96,4%. El valor predictivo negativo fue de 95,8% cuando se comparó con la observación microscópica y de 96% frente a CAN. En la Tabla 1 se puede observar la comparación de las diferentes técnicas para el diagnóstico de *S. stercoralis* (Tabla 1). La qPCR incrementó la detección de estrongiloidosis en un 12% respecto de la PCR de punto final.

Tabla 1: Diagnóstico de *S. stercoralis*. Comparación de la eficacia de la PCR y los métodos de referencia. VPN: valor predictivo negativo. VPP: valor predictivo positivo.

Método	Sensibilidad %	Especificidad %	VPN%	VPP%
qPCR	96,4	32,8	95,83	36,4
cPCR	100	32	100	45,0
CAN	36,4	95,8	32,8	96,4

## 3. Seguimiento de pacientes post tratamiento

Se evaluaron 12 pacientes con diagnóstico de estrongiloidosis. Todos recibieron tratamiento antiparasitario en el momento del diagnóstico inicial y fueron seguidos periódicamente durante hasta 4 años post tratamiento mediante examen en fresco, cultivo en agar nutritivo (CAN), cPCR, y qPCR, recuento de eosinófilos.



- Repetto S y col. 2013. *Acta Trop.* 126:110-114.
- Repetto SA y col. 2016. *Acta Trop.* 157:169-77.
- Repetto SA y col. *Clin Infect Dis.* 2018 2;66(10):1558-1565.
- Satoh M y col. 2004. *Exp. Opin. Pharmacother.* 5:2293-2301
- Siddiqui A y Berk S. 2001. *Clin. Infect. Dis.* 33:1040-1047.
- Verweij J y col. 2009. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103:342-346.



## ABSTRACT

Strongyloidosis is a chronic, neglected disease, whose severe forms cause up to 80% mortality in humans as a result of underdiagnosis owing to the lack of sensitive laboratory techniques.

Parasitological cure is defined as the absence of larvae in feces 1 to 2 years after treatment. Nevertheless, evidence lacks about the efficacy of ivermectin to treat chronic disease, characterized by host reinfection by autoinfecting larvae. Moreover, fluctuating larval excretion precludes confirming parasite eradication. Then, negative parasitological tests should not be interpreted as absence of infection.

Although other authors reported ivermectin treatment efficacy, a long-term follow up study from our laboratory evidenced infection reactivation in treated patients.

On the basis that molecular diagnosis would allow early reactivation detection and prevent the development of severe forms, we designed a real-time PCR method (qPCR) to detect *S. stercoralis* and quantitatively monitor parasite load in ivermectin treated patients with no risk of current exogenous infection.

Larvae were observed in 28 out of 98 evaluated patients. Endpoint PCR and qPCR were positive for 63/98 and 74/98 patients, respectively. Calculated qPCR sensitivity was 96.4% and negative predictive value was 95.8% and 96% when compared to microscopic larvae observation and agar plate culture, respectively. So, qPCR increased the detection of strongyloidosis by 12% compared to endpoint PCR.

A 4 year-follow up study of these patients revealed that 7 out of 12 reactivated the infection after treatment. Along the study period, neither parasite loads nor eosinophil counts showed significant variations. Moreover, no correlation was found between eosinophil counts and parasite loads, regardless of larval reactivation.

We conclude that more patients should be long-term evaluated to assess the kinetics of parasite load after treatment. Post-treatment parasite detection by qPCR is consistent with the persistently positive endpoint PCR described by our group for patients diagnosed with *S. stercoralis*.

# VÍAS ASOCIADAS AL DESARROLLO DE LA ENDOMETRIOSIS (EDT) Y ESTUDIO DE TERAPIAS NATURALES ACORDES PARA SU TRATAMIENTO

Dra. Analía Ricci

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CONICET

## RESUMEN

La endometriosis (EDT) es una de las enfermedades ginecológicas benignas más frecuentes en mujeres de edad reproductiva<sup>1</sup>. Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina y afecta alrededor del 10% de la población femenina<sup>2</sup>, mientras que la prevalencia entre mujeres que presentan infertilidad varía entre un 35 y un 50%<sup>1</sup>.

La EDT produce dolores pélvicos agudos previos o intramenstruales y/o dolor abdominal crónico. Otra consecuencia frecuente de esta patología es la infertilidad y se estima que entre un 50% y un 80% de las pacientes son infértiles<sup>2</sup>.

Mucho se ha investigado y aún hoy continuamos buscando factores involucrados en la susceptibilidad de una mujer para desarrollar esta enfermedad. La búsqueda de este conocimiento intenta contribuir al desarrollo de terapéuticas más eficientes e inocuas.

A pesar de tratarse de una enfermedad benigna, la EDT presenta algunos mecanismos fisiopatológicos similares a los que presenta una neoplasia<sup>3</sup>. En los últimos años el avance de la investigación científica en este campo ha desviado su atención hacia los productos naturales, como son los lignanos provenientes de las especies *Podophyllum peltatum* de América y *Podophyllum Hexadrum* de la India.

En esta oportunidad enfocamos nuestro estudio en un compuesto con demostrada actividad anti-mitogénica: la Picropodofilina (PPP). La PPP es un lignano que actúa como inhibidor selectivo del receptor del factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-1R)<sup>4</sup>. El IGF-1R juega un rol importante en la transformación, proliferación y crecimiento de células malignas<sup>5,6</sup>, así como también en el mantenimiento del fenotipo maligno y en su protección contra la terapia antitumoral<sup>7</sup>. Está involucrado en distintos tipos de cáncer y su activación modula la angiogénesis aumentando la expresión de VEGF<sup>8</sup>. Más aún, se ha determinado que diferentes tipos de tumores no pueden desarrollarse en la ausencia de un cierto nivel funcional de IGF-1Rs<sup>7</sup>. En contraste, el IGF-1R no es en absoluto un requerimiento para el crecimiento de células normales.

Existen diversos trabajos que resaltan la actividad de PPP y sus derivados. Se ha demostrado que inhibe eficientemente la fosforilación de IGF-1R sin interferir con la actividad del receptor de la insulina (IR), siendo el primer inhibidor capaz de discriminar entre ambos receptores<sup>9</sup>. De esta manera, la PPP puede actuar en enfermedades IGF-1R dependientes tales como el cáncer, acromegalia, soriasis, cirrosis, y aterosclerosis entre otras, sin inducir diabetes.

En pacientes con EDT se han detectado niveles elevados de IGF-1 en el líquido peritoneal<sup>10</sup> así como también una mayor expresión en el tejido endometrial ectópico respecto del eutópico<sup>11</sup>. Se postula que la EDT puede estar asociada al fenómeno de menstruación retrograda, mientras que el crecimiento del tejido endometrial en un sitio ectópico es dependiente de hormonas esteroideas y de factores de crecimiento locales como IGF-1<sup>12</sup>. Más aún se ha demostrado que las células endometriales ectópicas poseen menores niveles de apoptosis en comparación con las células eutópicas y se ha sugerido que el IGF-1 es uno de los factores que contribuyen a inhibir ese proceso<sup>13</sup>.

Por otra parte, se ha descrito que existe una sobreexpresión de IGF-1R en diversos tumores malignos, pero aún no existen antecedentes al respecto en EDT.

De los antecedentes mencionados se desprende la posibilidad de emplear la inhibición del IGF-1R como blanco terapéutico para el control de la EDT. En estudios recientes realizados en melanomas se ha demostrado que la PPP produjo la regresión del tumor y atenuó los mecanismos involucrados en la invasión de las células tumorales<sup>14</sup>. Asimismo ha sido demostrado que la PPP inhibe la angiogénesis tumoral mediante la inhibición de la secreción de VEGF<sup>15</sup>. Este producto ha demostrado no provocar efectos secundarios importantes y por lo tanto, es un objetivo atractivo a la hora de proponer una terapia inocua. Hasta el momento no ha sido ensayada su posible aplicación como tratamiento de la EDT.

Enmarcado en el mismo sistema, decidimos estudiar la regulación de las proteínas reguladoras de la actividad de IGF-1. La familia de proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) consiste en 7 proteínas cuyos ligandos, IGF-I e IGF-II, se encuentran en una amplia variedad de tejidos y actúan principalmente a través del receptor IGF-1 promoviendo la proliferación celular, supervivencia, diferenciación y migración. IGFBPs regulan la actividad de IGF modulando su disponibilidad. Ambos ligandos poseen mayor afinidad por las IGFBPs que por los receptores IGF-1, y para su interacción con el receptor es necesaria la disociación con la proteína de unión<sup>10</sup>. Hasta el momento no existen antecedentes que describan la disponibilidad de algunas de estas proteínas en pacientes con endometriosis, así como tampoco se conoce si existe una regulación diferencial entre el tejido eutópico y el tejido ectópico en pacientes con endometriosis.

## Objetivos

---

- Caracterizar la expresión de proteínas claves en el sistema IGF-1/IGF-1R en el tejido endometrial eutópico y ectópico de pacientes con y sin endometriosis, y establecer posibles diferencias en su expresión según el grado de severidad de la enfermedad.
- Evaluar la inhibición del IGF-1R como blanco terapéutico para el control de la endometriosis, por medio del uso de la picropodofilina (PPP).

## Resultados

---

### Expresión de IGF-1R en tejido endometrial de mujeres diagnosticadas con EDT.

En primer lugar analizamos la expresión de las dos subunidades que conforman el receptor IGF-1R en tejido eutópico de pacientes con endometriosis y la comparamos a la expresión respectiva en endometrio de mujeres controles. No se encontraron cambios en la subunidad  $\alpha$  según la presencia de la enfermedad. Sin embargo, se observó una menor expresión de la subunidad  $\beta$  en pacientes con endometriosis respecto de pacientes control ( $p < 0.001$ ).

Luego analizamos las diferencias de expresión de ambas subunidades entre el tejido eutópico y el tejido ectópico de pacientes con endometriosis. No observamos diferencias en la expresión de la subunidad  $\beta$  pero la subunidad  $\alpha$  mostró una menor expresión en el tejido ectópico respecto del eutópico ( $p < 0.01$ ).

A partir de estos resultados, nos propusimos comparar la expresión de IGF-1R  $\alpha$  y  $\beta$  de cada tejido (eutópico o ectópico) en presencia de distintos grados de severidad de EDT (I-II vs III-IV). No observamos diferencias en la expresión de la subunidad  $\alpha$  entre distintos grados de severidad, ya sea en tejido eutópico o ectópico. Sin embargo encontramos una menor expresión de IGF-1R $\beta$  en estadios iniciales ( $p < 0,05$  vs III-IV). Esta diferencia significativa se observó tanto en el tejido eutópico como en el ectópico de pacientes con EDT.

### Expresión de IGFBP3 en tejido endometrial de mujeres diagnosticadas con EDT.

Los niveles de IGFBP3 se encuentran disminuidos en el tejido eutópico de pacientes con EDT respecto al de mujeres controles ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, al analizar la expresión de IGFBP3 en el tejido endometrial de las pacientes con EDT, observamos una mayor expresión en el tejido ectópico respecto del eutópico ( $p < 0,05$ ).

Al desglosar este resultado según el grado de severidad analizado, observamos que el aumento de IGFBP3 en el tejido ectópico respecto del eutópico se observa solo en estadios iniciales ( $p < 0.01$  vs III-IV), sin presentar diferencias los tejidos eutópico y ectópico en estadios avanzados (III-IV).

También realizamos el análisis inverso, y organizando los datos comparamos los niveles de la proteína en un mismo tejido (ya sea en eutópico o ectópico) pero en presencia de distintos estadios de endometriosis (I-II vs III-IV). Sorpresivamente, también encontramos que los niveles de IGFBP3 presentes en un mismo tejido resultan ser diferentes según el grado de severidad. El tejido eutópico presenta un aumento en IGFBP3 en estadios avanzados ( $p < 0,05$  vs. I-II), y el tejido ectópico presenta menores niveles de IGFBP3 en estadios avanzados ( $p < 0,05$  vs. I-II).

### Efecto de PPP sobre la proliferación celular de CEE.

Para abordar el segundo objetivo realizamos cultivos primarios células estromales endometriales humanas (CEE) provenientes de biopsias de tejido ectópico de pacientes con endometriosis, y evaluamos el efecto directo de la PPP in vitro sobre la supervivencia de las células. No observamos efectos significativos en el porcentaje de proliferación celular para ninguna de las dosis ensayadas de PPP respecto del basal.

A partir de este resultado, realizamos un segundo ensayo en presencia o ausencia de IGF-1. La tendencia tampoco mostró diferencias en el porcentaje de proliferación celular respecto al basal.

Si bien muchos trabajos muestran a la PPP como una opción para tratar diferentes tipos de cáncer con células IGF-1R positivas<sup>17</sup>, nuestros resultados, aunque son preliminares y quedan muchos estudios por realizar, no resultaron promisorios respecto a su utilidad en la endometriosis. No observamos una inhibición de la proliferación celular para ninguna de las dosis ensayadas aun cuando incubamos al compuesto en presencia de IGF-1, simulando las condiciones fisiológicas. Cabe destacar que en otros trabajos<sup>18,19</sup> para probar el efecto de PPP sobre la proliferación celular, la incubación con IGF-1 fue posterior a un pretratamiento con la droga, aunque esa metodología no represente las condiciones fisiológicas. Otra de las hipótesis a revisar antes de descartar a PPP como opción terapéutica, es el hecho de que el compuesto estuviese oxidado. A pesar de haber respetado las recomendaciones del proveedor en cuanto al modo de conservarlo y de conocer el tiempo de vencimiento de la PPP, no descartamos la posibilidad de que haya perdido su principio activo.

## Discusión

---

En referencia a la relación del IGF-1R con el desarrollo de la patología, en este trabajo encontramos resultados concluyentes que indican que a diferencia de los antecedentes bibliográficos, la subunidad  $\alpha$  no se ve alterada en presencia de la enfermedad en el tejido eútopico. Asimismo pacientes con endometriosis presentan una menor expresión de esta subunidad en su tejido ectópico, respecto de su propio eutópico. En contraste se observa una reducción de la subunidad  $\beta$  en el tejido eutópico de pacientes con EDT al compararlo con pacientes sanas. Del mismo modo, al analizar diferencias intrínsecas del grado de severidad observamos que los estadios iniciales (I-II) presentan una menor expresión de esta subunidad respecto de los avanzados, diferencia que se observa tanto en tejido eutópico como en ectópico.

Como mencionamos previamente el IGF-1R juega un rol importante en la transformación, proliferación y crecimiento de células malignas. Ahora podríamos preguntarnos si la funcionalidad del receptor se ve modificada en presencia de la endometriosis, dado que no se observan cambios en la expresión la subunidad  $\alpha$  localizada en el dominio extracelular, y la subunidad  $\beta$  localizada en el dominio intracelular se ve reducida. En presencia de la funcionalidad reducida podríamos postular que el receptor IGF-1R no se vincula con el mantenimiento del tejido endometrial en un sitio ectópico. Sin embargo, al comparar la expresión de la subunidad  $\beta$  en pacientes con distinto diagnóstico de EDT, observamos que resulta ser menor en estadios iniciales de la enfermedad.

Por otra parte, analizamos la regulación de IGFBP3. Como mencionamos, las proteínas IGFBP regulan la actividad de IGF modulando su disponibilidad, ya que ambos ligandos requieren de la previa disociación con las IGFBP para interactuar con el receptor. En este trabajo observamos una menor expresión de IGFBP3 en pacientes con EDT, lo cual aumentaría la disponibilidad de ligando libre para unirse a IGF-1R. Esto podría explicar una reducción en la expresión del receptor como producto de una retroalimentación negativa en el sistema. Contrario a esto algunos modelos de cáncer postularon que la IGFBP3 posee un efecto potenciador de la actividad de IGF-1 facilitando la llegada de IGF-1 al receptor blanco. Esta última hipótesis podría explicar la mayor expresión de la proteína de unión en el tejido ectópico de las pacientes con respecto al eutópico.

Este trabajo representa el primer reporte en bibliografía respecto de la implicancia del sistema IGF-1/IGF-1R en el desarrollo de la endometriosis considerando regulaciones diferenciales atribuibles al grado de severidad de la patología. La expresión alterada de esta vía en biopsias completas de pacientes aporta una nueva pieza para comprender la etiopatogenia multifactorial que caracteriza esta patología.

Este trabajo sugiere la necesidad de seguir profundizando en esta vía para encontrar nuevos posibles marcadores y/o blancos terapéuticos acordes al grado de severidad de la enfermedad y a las necesidades del paciente según el diagnóstico.

## Referencias Bibliográficas

---

1. Giudice, L.C. & Kao, L.C. Endometriosis. *Lancet* **364**, 1789-1799 (2004).
2. Eskenazi, B. & Warner, M.L. Epidemiology of endometriosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **24**, 235-258 (1997).
3. Varma, R., Rollason, T., Gupta, J.K., & Maher, E.R. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction*. **127**, 293-304 (2004).
4. Menu, E. et al. Targeting the IGF-1R using picropodophyllin in the therapeutical 5T2MM mouse model of multiple myeloma: beneficial effects on tumor growth, angiogenesis, bone disease and survival. *Int. J. Cancer* **121**, 1857-1861 (2007).
5. LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., & Roberts, C.T., Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* **16**, 143-163 (1995).
6. Ohshima-Hosoyama, S., Hosoyama, T., Nelson, L.D., & Keller, C. IGF-1 receptor inhibition by picropodophyllin in medulloblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 727-732 (2010).
7. Baserga, R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res.* **55**, 249-252 (1995).
8. Mazitschek, R. & Giannis, A. Inhibitors of angiogenesis and cancer-related receptor tyrosine kinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 432-441 (2004).
9. Girnita, A. et al. Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res.* **64**, 236-242 (2004).
10. Kim, J.G. et al. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis. *Fertil. Steril.* **73**, 996-1000 (2000).
11. Milingos, D.S. et al. Insulinlike growth factor-1Ec (MGF) expression in eutopic and ectopic endometrium: characterization of the MGF E-peptide actions in vitro. *Mol. Med.* **17**, 21-28 (2011).
12. Giudice, L.C. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* **61**, 1-17 (1994).
13. Koutsilieris, M. et al. Increased insulin-like growth factor I activity can rescue KLE endometrial-like cells from apoptosis. *Mol. Med.* **7**, 20-26 (2001).
14. Duan, Z. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase inhibitor cyclolignan picropodophyllin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2122-2130 (2009).
15. Economou, M.A. et al. Inhibition of VEGF secretion and experimental choroidal neovascularization by picropodophyllin (PPP), an inhibitor of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 2620-2626 (2008).

16. Madanes, D. et al. *PI3K/AKT pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage. Gynecol Endocrinol.* 10.1080/09513590.2019.1680627
17. Rostoker, R. et al. *Investigating new therapeutic strategies targeting hyperinsulinemia's mitogenic effects in a female mouse breast cancer model. Endocrinology* 2013 .10.1210/en.2012-2263
18. Attias-Geva, Z. et al. *Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) targeting with monoclonal antibody cixutumumab (IMC-A12) inhibits IGF-I action in endometrial cancer cells. European journal of cancer* 2011. 10.1016/j.ejca.2011.02.019.
19. Mendivil, A et al. *AMG 479, a Novel IGF-1-R Antibody, Inhibits Endometrial Cancer Cell Proliferation Through Disruption of the PI3K/Akt and MAPK Pathways. Reprod Sci* 2011. 10.1177/19337191111398501

## ABSTRACT

---

Endometriosis (EDT) is a chronic disease, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Current treatments focus on analgesic-driven pain relief, removal of implants through laparoscopic surgery and prevention of recurrence through continuous hormonal treatments. Much has been researched and even today we continue to looking for factors involved in a woman's susceptibility to develop this disease. The search for this knowledge tries to contribute to the development of more efficient and innocuous therapeutics.

Insulin-like growth factor I (IGF-1R) is known to play an important role in the transformation, proliferation and growth of malignant cells, as well as in the maintenance of the malignant phenotype and its protection against antitumor therapy. Due to the limited background of the system involving IGF-1R activity, we set out to characterize the expression of its key proteins (IGF-1R/IGFBPs) in eutopic and ectopic endometrial tissue of patients with and without endometriosis, and to establish possible differences in their expression according to the severity stage. We have observed differential expression of IGFBP3, and IGF-1R $\alpha$  and  $\beta$ .

This work represents the first report in the literature regarding the implication of the IGF-1/IGF-1R system in the development of endometriosis considering differential regulations attributable to the degree of severity of the pathology. The altered expression of this pathway in complete biopsies of patients with EDT contributes a new piece to understand the multifactorial etiology that characterizes this disease. This work suggests the need to continue deepening in this way to find new possible markers and/or therapeutic targets suitable to disease severity and the needs of the patient according to the diagnosis.



# INFECCIONES POR LEVADURAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS HOSPITALIZADOS

Florencia Dinorah Rojas

Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste.  
Dpto. de Micología

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas nosocomiales representan una importante causa de morbimortalidad en el mundo, y están asociadas a elevados costos al sistema médico sanitario. A medida que la medicina contemporánea avanza en mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedades malignas, con trasplante de órganos y trastornos autoinmunes, las infecciones fúngicas invasoras se convierten en una complicación cada vez más importante. En los últimos años, se ha observado un importante aumento de las micosis diseminadas y un cambio en la frecuencia y diversidad de las especies que las producen (1–3). En Estados Unidos, la sepsis relacionada con infecciones fúngicas aumentó en un 207%, desde algo más de 5.000 casos en 1979 hasta más de 16.000 episodios en el año 2000, siendo *Candida* spp. el hongo aislado con mayor frecuencia (4). El análisis de los datos a través del National Nosocomial Infections Surveillance System reveló un incremento en la incidencia de 2,0 a 3,8 infecciones fúngicas/1000 pacientes, donde el 78% de las mismas fueron causadas por levaduras del género *Candida*. Este mismo estudio reveló que entre los microorganismos que causaban infección del torrente sanguíneo aislados en hemocultivos, los hongos ocuparon el 4º lugar, más frecuentes incluso a patógenos tan comunes como *Escherichia coli*. Entre el 8-10% del total de infecciones adquiridas por vía hematogena fueron producidas por las especies del género *Candida*, resultado en un aumento del 487% en su frecuencia durante la década en estudio (5). Un estudio multicéntrico realizado por Nucci y col. entre 2008 al 2010, demostró que Argentina fue el país de Latinoamérica con la tasa más alta de candidemia, 1,95 casos /1000 admisiones y 0,24 casos cada 1000 pacientes día. Además mostró que el 44,2 % de los niños de UCI habían sufrido, al menos, un episodio de candidemia durante su internación (6).

El género *Candida* se comporta como un importante patógeno nosocomial, junto a otras levaduras antes consideradas saprofitas, inocuas o que raramente producían enfermedad (4,6,7,12–14). Durante muchas décadas, *Candida albicans* (*C. albicans*) fue la especie más frecuente causante de infecciones fúngicas. A pesar de que en la actualidad aún se recupera con elevada frecuencia en muestras clínicas, los aislamientos de levaduras no - *C. albicans* ha ido incrementando notablemente en los últimos años, y en ciertos casos, este grupo supera en número a los aislamientos de *C. albicans* (13–17).

En general, los datos informados en relación a la epidemiología, diagnóstico, tratamiento de las infecciones fúngicas han sido obtenidos de estudios realizados en pacientes adultos, siendo la población pediátrica excluida, en general, de este tipo de análisis. Los recién nacidos prematuros, los pacientes pediátricos con cáncer, los niños con inmunodeficiencias con inmunodeficiencias primarias o adquiridas como el SIDA, y aquellos pacientes que requieren largas permanencias en unidad de cuidados intensivos representan grupos de riesgo para desarrollar infecciones fúngicas invasoras.

Los estudios de vigilancia longitudinal de instituciones individuales, ciudades, países y regiones geográficas amplias han documentado este surgimiento de especies no *C. albicans*, así como su mayor resistencia a los antifúngicos de uso clínico. Se ha demostrado que la resistencia a fluconazol y equinocandinas es más común entre especies no *C. albicans* en comparación con *C. albicans*, y en parte se debe a que existen algunas de estas especies con inherente resistencia a los antifúngicos, como por ejemplo *C. krusei* a fluconazol, y otras como *C. glabrata*, con capacidad de adquirir resistencia secundaria a las drogas antifúngicas (13,18–22).

Más de 30 especies han sido notificadas como agentes etiológicos de candidiasis invasivas. Entre los pacientes pediátricos, las especies más comúnmente informadas son *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (7,8, 12, 17,23–25), y en menor frecuencia *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* y levaduras de otros géneros, como *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Pichia* y *Hansenula* (7, 11,12, 15, 24,26,27). Por otro lado, el uso de métodos de identificación molecular resultó en el descubrimiento de nuevas especies dentro de complejos de especies más grandes por ejemplo, dentro de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* entre otras, ampliando de esta manera la diversidad de especies que producen enfermedad (28,29).

La mayoría de las especies del género *Candida* han sido reconocidas como parte de la microbiota normal de la piel, las mucosas, el tracto gastrointestinal y los aparatos genital y urinario del ser humano (30). Sin embargo, en determinadas situaciones que alteran o modifican el equilibrio existente entre individuo-*Candida*, la levadura puede comportarse como un patógeno oportunista y producir una gran variedad de enfermedades (31). La ruptura de este equilibrio puede deberse por uno o varios factores, como ser disminución de las defensas del hospedador de origen fisiológico (edades extremas, embarazo), enfermedades de base preexistente (diabetes, endocrinopatías etc), inmunosupresión (virus de inmunodeficiencia humana (VIH), leucemia), tratamientos prolongados (quimioterapia, corticoterapia), entre otros. O bien, por la disrupción anatómica de barreras del hospedero debido a situaciones tales como quemaduras, la implantación de dispositivos médicos o cirugías invasoras. Cualquier tipo de interrupción de la barrera epitelial, ya sea por causas traumáticas o quirúrgicas, favorece la penetración de los microorganismos que constituyen la microbiota a la circulación. Esta situación pueden ocurrir también en casos por ejemplo, de cirugía abdominal o con el uso de catéteres venosos y urinarios que irrumpen la barrera epitelial (26,31).

La detección de *Candida* en muestras clínicas puede representar una colonización, infección local o infección invasiva. En pacientes hospitalizados, los microorganismos que participan en las infecciones provienen de fuentes endógenas y exógenas (32). Entre las primeras se incluye tubo digestivo, la mucosa vaginal, la uretra y la piel. La colonización masiva del intestino, así como el daño producido en las mucosas del aparato digestivo, pueden favorecer la translocación de las levaduras a través de las mucosas hacia los vasos linfáticos y de éstos al torrente sanguíneo, dando así origen a las fungemias (30,32,33). Entre las infecciones de origen exógeno, deben señalarse las ocasionadas por soluciones de nutrición parenteral contaminadas, procedimientos quirúrgicos, las soluciones endovenosas y la infección de válvulas cardíacas y otras prótesis (14, 32,34). Las infecciones producidas por levaduras incluyen una serie de enfermedades que pueden afectar a la mayoría de los sistemas del cuerpo, produciendo desde enfermedades mucocutáneas leves y funguria, a infecciones graves profundas como meningitis, endocarditis e infecciones intraabdominales.

El término funguemia se utiliza para designar la presencia de hongos en sangre, detectadas mediante el hemocultivo. Se producen cuando los microorganismos invaden el torrente

sanguíneo y se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos. Esta invasión puede producirse desde un foco infeccioso extravascular, a través de los capilares sanguíneos o de los vasos linfáticos, o desde un foco intravascular (endocarditis, infecciones de catéteres intravasculares o arteriales)(35). La detección de las fungemias constituye una de las prioridades del sistema de salud; las levaduras que invaden el torrente circulatorio pueden diseminarse, principalmente en bebés donde a su sistema inmunes aun inmaduro, e invadir otros órganos. Por estas razón, las funguemia están asociadas a una elevada mortalidad, informada entre un 10 a 50 % , principalmente entre pacientes pediátricos (36,37).

En los últimos años, el diagnóstico de laboratorio de las infecciones fúngicas ha mejorado con la llegada de nuevos métodos para el aislamiento y la identificación de hongos. Se han utilizado con éxito nuevas tecnologías tales como la detección de anticuerpos y antígenos, y las nuevas técnicas moleculares para la tipificación y detección de patógenos fúngicos en algunos casos a partir de la muestra (29). La utilización de herramientas moleculares ha permitido desarrollar nuevos métodos de identificación de *Candida*, lo que lleva a la identificación de nuevas especies junto con su mayor reconocimiento en la infección humana. Estos estudios adicionales revelan diferencias genómicas que han conducido a la separación de especies en levaduras estrechamente relacionadas pero distintas, como por ejemplo en el caso de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans* entre otras (38,39).

A pesar de que las técnicas moleculares han permitido un gran avance en el diagnóstico microbiológico, muchos de estos métodos aún no se han estandarizado ni validado en ensayos clínicos y, por lo tanto, no se utilizan ampliamente en los laboratorios microbiológicos, además de las otras condiciones que limitan no disponer del presupuesto adecuado en los nosocomios públicos de nuestra región. Actualmente la gran mayoría del diagnóstico de infecciones fúngicas en nuestra región se basan en metodologías convencionales, no moleculares debido a la cantidad reducida de equipos de PCR en los laboratorios hospitalarios y los escasos recursos disponibles. El cultivo y el examen microscópico siguen siendo el "estándar de oro" aunque son en general, pocos sensibles. Los análisis de antígeno, como los sistemas de detección de galactomananos y glucanos, se usan aunque no con frecuencia, pero estas pruebas varían en sensibilidad y especificidad, dependiendo de la población de pacientes involucrados.

El diagnóstico de infecciones fúngicas es un desafío, particularmente en el hospedero inmunocomprometido. Los signos y síntomas son inespecíficos, la colonización es difícil de distinguir de la enfermedad invasiva, los hemocultivos pueden ser negativos y los pacientes a menudo no pueden someterse a procedimientos de diagnóstico invasivos. Pero la importancia de determinar la epidemiología de nuestra región, además de conocer las especies prevalentes, es esencial a fines de tomar medidas de prevención de la colonización y/o infección hospitalariaa y de esa forma poder establecer una terapéutica eficaz. La detección temprana y el tratamiento de infecciones debidas a especies del género *Candida* y otras levaduras, son la llave para disminuir el riesgo de la morbi-mortalidad de estos pacientes.

## **OBJETIVO**

Determinar la frecuencia de especies de levaduras aisladas de muestras clínicas de pacientes pediátricos hospitalizados y neonatos de unidades de cuidados intensivos.

Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de especies de levaduras aisladas de muestras clínicas de pacientes neonatos internados en unidades de cuidados intensivos.
- Determinar la frecuencia de especies de levaduras aisladas de muestras clínicas de pacientes pediátricos hospitalizados.
- Comparar las frecuencias de especies de levaduras aisladas obtenidas de pacientes pediátricos y de neonatos
- Conocer la frecuencia de especies como agentes de candidemias y colonizadores de catéteres en pacientes pediátricos.
- Conocer la frecuencia de especies como agentes colonizadores en neonatos en unidades de cuidados intensivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Entre agosto de 2016 y agosto de 2018 se estudiaron todas las levaduras aisladas de muestras clínicas de pacientes pediátricos del Hospital Pediátrico “Juan Pablo II” de la ciudad de Corrientes y de pacientes neonatos de sanatorios privados de la ciudad de Resistencia. Las mismas fueron derivadas al Departamento de Micología del Instituto de Medicina Regional - Universidad Nacional del Nordeste, para su identificación y estudio de sensibilidad antifúngica.

### 1. Identificación:

Para realizar la identificación de cada levadura, se realizaron pruebas en base a características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de cada espécimen.

- Detección de ureasa
- Examen en fresco con tinta china
- Estudio micromorfológico por crecimiento en agar leche.
- Siembra en medios cromogénicos (CHROMagar Candida, Medica- Tec, Argentina).
- Prueba de asimilación de trehalosa para identificación presuntiva de especies del complejo *C. glabrata*

La identificación definitiva de los aislados fue realizada empleando sistema comercial API ID 32C (*BioMérieux, Argentina*).

### Producción de ureasa

El medio de urea (ver Anexo medios de cultivos) contiene rojo de fenol como indicador, que vira de amarillo a rojo poniendo de manifiesto la actividad de la enzima. Esta prueba se utilizó para la identificación presuntiva de especies de *Cryptococcus* y *Trichosporon*, que resultan positivas.

### Examen en fresco con tinta china

Se utilizó para observar levaduras con cápsulas, presuntivas del género *Cryptococcus*. Se colocó una gota de una suspensión de la levadura en estudio, o de la muestra clínica, más una gota de tinta china entre porta y cubreobjeto, se observó al microscopio óptico. Se consideró positivo cuando se observaron levaduras refringentes rodeadas por una cápsula de 1-20 micrones de espesor.

## Micromorfología

A fin de realizar la identificación presuntiva de ciertas especies, se utilizó Agar leche (Ver anexo), que permitió visualizar la formación de hifas y pseudomicelio, blastoconidias, clamidoconidias y/o artroconidias (40). La levadura incógnita se sembró tocando suavemente la superficie del agar con un ansa y luego se cubrió con un cubreobjetos estéril. La placa se incubó a 37°C, de 3 a 7 días.

## Siembra en medios cromogénicos

Se utilizó el medio de CHROMagar *Candida*®. El mismo contiene sustratos enzimáticos unidos a compuestos cromogénicos que producen un color determinado en presencia de enzimas específicas de especie. Su utilización permitió la identificación presuntiva de *C. albicans* que desarrolla de color verde, *C. tropicalis* de color azul y *C. krusei* de color rosa y aspecto seco. Las demás especies desarrollaron colores y tonalidades inespecíficos (blanco, crema, rosa) y no pueden ser identificadas.

La levadura incógnita se sembró en placas con el medio cromogénico y se incubó a 37°C, durante 48 a 72 h, de acuerdo a indicaciones establecidas por el fabricante.

## Sistemas comerciales para identificación definitiva

Se utilizó el sistema API ID 32 C (bioMérieux, Argentina) que consiste en un panel descartable de 32 pocillos, que contienen 29 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos), una prueba de sensibilidad a cicloheximida, una prueba colorimétrica para determinar hidrólisis de la esculina y un control negativo.

La siembra se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó lectura visualmente a las 48 h de incubación a 30 °C. El crecimiento (positivo) se determinó por presencia de turbidez en cada pocillo. Los resultados se convirtieron en un biocódigo numérico de 8 dígitos que permite la identificación a través de un manual (ID 32C, índice analítico de perfiles).

## RESULTADOS

Se procesaron un total de 61 levaduras obtenidas a partir de 48 pacientes. Del total de pacientes, 38 fueron pediátricos (entre 2 meses a 16 años) y 10 neonatos (0 hasta 3 meses de edad) internados en unidades de cuidados intensivos (UCIN). La **tabla 1** muestra las especies aisladas de acuerdo a la población de pacientes.

Tabla 1. Frecuencias de especies aisladas en pacientes pediátricos y neonatos.

	Neonatos	Pediátricos	Total	Porcentajes
<i>C. albicans</i> complex	2	17	18	28,6
<i>C. tropicalis</i>	1	12	13	20,7
<i>C. parapsilosis</i> complex	2	10	12	19,0
<i>C. glabrata</i> complex	1		1	1,58
<i>C. guilliermondii</i>	3	3	6	9,51
<i>C. lusitaniae</i>	2		2	3,18
<i>C. krusei</i>	1	3	4	6,34
<i>C. catenulata</i>		1	1	1,58
<i>C. haemulonii</i> complex		2	2	3,18
<i>T. asahii</i>			1	1,58
<i>Cr. neoformans</i> complex		3	3	4,75
Total	12	49	63	100

C: *Candida*, T: *Trichosporon*; Cr: *Cryptococcus*

Las levaduras fueron obtenidas de las siguientes muestras: 25 de orina, 27 de hemocultivos, 3 LCR, una muestra de catéter, una de escara, un absceso, una biopsia de hueso, una de medula ósea, dos líquidos pleurales y una de secreción de oído.

La **tabla 2** muestra las especies aisladas de hemocultivos y orinas. En los LCR se aislaron en 2 ocasiones *C. albicans* y en el segundo *Cr. neoformans* de un paciente que también tuvo un aislamiento de la misma especie en secreción de oído.

Las levaduras aisladas en la biopsia de hueso y en la punción de medula ósea fueron *C. parapsilosis*. *Candida catenulata* fue aislada de la escara de un paciente quemado. Un mismo paciente presentó dos aislamientos de *C. tropicalis* en el líquido pleural. Por último, la levadura obtenida del absceso también resultó *C. tropicalis*. El aislamiento del *Trichosporon asahii* se obtuvo a partir de una muestra de catéter.

En muestras de hemocultivos, la frecuencia de especies fue *C. albicans* (29,6%), *C. parapsilosis* (29,6%), *C. guilliermondii* (18,5%), *C. tropicalis* (7,4%) y otras (14,9%), mientras que en muestras de orina fue *C. albicans* (32%), *C. tropicalis* (32%), *C. krusei* (12%), *C. parapsilosis* (8%), y otras (16%).

Hubo 10 pacientes donde las levaduras fueron aisladas de diferentes sitios anatómicos, donde las levaduras fueron: 1 de orina y 1 líquido peritoneal en dos ocasiones (*C. tropicalis*); 1 de hemocultivo y orina (*C. guilliermondii*) y en otro paciente uno de hemocultivo y uro a *C. krusei*; 1 de LCR y secreción de oído (*Cr. neoformans*).

Tabla 2. Especies obtenidas en muestras de sangre y orina

Especies	Orina	Sangre
<i>Candida albicans</i> complex	8	8
<i>C. parapsilosis</i> complex	2	8
<i>C. tropicalis</i>	8	2
<i>C. glabrata</i> complex	1	
<i>C. krusei</i>	3	1
<i>C. guilliermondii</i>	1	5
<i>C. lusitaniae</i>	2	
<i>C. haemulonii</i>		2
<i>Cr. neoformans</i>		1
TOTAL	25	27

En 7 pacientes hubo levaduras que fueron aisladas en distintas ocasiones: 1° paciente dos hemocultivos con *C. albicans*; 2° dos hemocultivos con *C. haemulonii*; 3° cuatro hemocultivos con *C. parapsilosis*; 5° dos orinas con *C. lusitaniae*; 6° dos orinas con *C. tropicalis*; 7° dos orinas con *C. albicans*.

Alguno de los factores de riesgo documentados entre nuestros pacientes fueron, internación en unidades de cuidados intensivos, cáncer, VIH, prematuridad, quemado, pero en la mayoría de los casos no se contó con la información del paciente.

## DISCUSIÓN

A medida que la medicina contemporánea avanza en el tratamiento de afecciones de alta mortalidad como trastornos autoinmunes, tumores malignos y trasplantes de órganos, las infecciones fúngicas invasoras constituyen una complicación cada vez más importante. Diferentes estudios han demostrado que *Candida* spp. sigue siendo la causa principal de enfermedad fúngica invasora y ocupan el cuarto lugar infecciones del torrente sanguíneo adquiridas en hospitales en pacientes pediátricos en los Estados Unidos y Europa (41–43). A pesar de los progresos realizados en los cuidados de los pacientes de alto riesgo, las infecciones fúngicas invasoras siguen estando asociadas con una tasa de mortalidad significativamente alta. Los estudios publicados en los últimos década señalan tasas de mortalidad en niños con candidemia entre el 19% y 31% (44–46), y estos valores aumentan en aquellos pacientes con mayor grado de inmunosupresión, y especialmente en casos de trasplante de células hematopoyéticas.

Este estudio pretende profundizar en algunos de los aspectos epidemiológicos de las infecciones producidas por levaduras en pacientes pediátricos internados en instituciones de nuestra región, con el fin de aprovechar la información obtenida como pauta para orientar el diagnóstico clínico y establecer tratamientos empíricos más adecuados de acuerdo con la prevalencia de las especies aisladas. Aunque muchos aspectos de los factores de riesgo y los algoritmos de tratamiento aprendidos en las últimas décadas usadas en pacientes adultos pueden emplearse en pacientes pediátricos, existen

parámetros propios en pediatría que deben ser establecidos en cada región para ser utilizados en el ejercicio clínico.

En este estudio, el **71,4 %** de las especies aisladas resultaron levaduras no - *C. albicans*. *C. albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia, y la triada *C. albicans* complex, *parapsilosis* complex, y *C. tropicalis* representó el **68,3%** de las especies más frecuente aisladas. Esta frecuencia es un poco menor a otros datos informados anteriormente en Argentina y Latinoamérica en donde, en general, aproximadamente el 80% de los aislamientos corresponde a estas tres especies (14,15, 20,21,47), y difiere de otros países como Alemania o Estados Unidos donde en algunos nosocomios *C. glabrata* complex ocupa el segundo lugar. La prevalencia de esta especie se deba probablemente al uso de FCZ como profilaxis (48–50).

### ***C. parapsilosis***

Este complejo de especies ha aumentado su incidencia en el mundo estableciéndose como la segunda *Candida* en frecuencia aislada de los hemocultivos en Asia, Latinoamérica y algunos países de Europa, e incluso en algunos centros llega a ser la especie más frecuente (15,51–57). En este estudio, las especies del complejo *C. parapsilosis* fueron encontradas en tercer lugar, pero como especie más frecuente junto con *C. albicans* en muestras de hemocultivos. Estudios previos realizados en nuestra región, ya la notificaron como una especie predominante en pacientes pediátricos, aislada con frecuencia en muestras de catéteres y hemocultivos (12,20). En Argentina fue el primer agente etiológico de candidemia en unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales, con una prevalencia de hasta 10 veces mayor que en adultos. Esta especie es agente causal de múltiples patologías tanto en huéspedes inmunocomprometidos como inmunocompetentes, y son los recién nacidos de bajo peso los más afectados (9, 12, 39, 54,58).

La alta incidencia de este complejo de especies como patógeno humano, se puede relacionar a que es considerado un importante microorganismo parte de la biota normal de la piel y a que también se ha demostrado su presencia en fluidos intravenosos, bombas de vacío utilizadas para la producción de nutrición parenteral y en cremas y pomadas empleadas en la piel (30, 52,59). Se la ha relacionado ampliamente al uso de la nutrición lipídica parenteral como con el uso prolongado de catéteres y otros dispositivos implantados, ya que presenta capacidad de adherencia y de formar biopelículas en la superficie interna de los mismos (52, 54,60–62).

*C. parapsilosis* se transmite en los nosocomios a través de las manos del personal y persiste en el ambiente hospitalario, resultando en una de las vías de infección horizontal por levaduras más comunes. Diferentes estudios reportan que *C. parapsilosis* complex se aísla de la piel del personal de salud con un rango de portación que varía entre el 17% al 75%, además de las superficies y de materiales médicos (45,48,51–53).

Considerando la elevada proporción de *C. parapsilosis* encontradas en este trabajo y debido a la gran relación que guarda *C. parapsilosis* con infecciones de tipo exógeno, son necesarias estrictas medidas preventivas de higiene y concientización en la importancia del lavado de manos antes y después del contacto con los pacientes, de esta manera disminuir la incidencia a dicha especie.



### ***C. albicans***

Históricamente, *C. albicans* representó entre el 70–80% de los aislamientos clínicos. Sin embargo, en los últimos 10 a 30 años, las especies no - *albicans* surgieron como importantes patógenos oportunistas de infecciones humanas y en algunos casos, como en este trabajo, superaron a *C. albicans* en frecuencia. Como se dijo previamente, este aumento podría estar relacionado con la existencia de mejores métodos de diagnóstico e identificación, el uso creciente y generalizado de ciertas prácticas médicas y la selección de especies más resistentes debido al uso más extendido de antifúngicos. En este trabajo, *C. albicans* fue la especie más prevalente, aunque fue alcanzada por *C. parapsilosis* en muestras de hemocultivos. La importancia de esta especie radica en que *C. albicans* es más virulenta que otras especies de *Candida* y se ha asociado con mayores tasas de daño en órganos y una mortalidad atribuible mayor (8). Esta levadura tiene la capacidad de desarrollar adherencia a células epiteliales y endoteliales, síntesis de enzimas hidrolíticas, formación de hifas y pseudohifas, cambio fenotípico, modulación antigénica, constituyendo un importante patógeno nosocomial (66). Un estudio realizado en pacientes neonatos, demostró que a pesar de la detección y el tratamiento, la tasa de mortalidad de la candidiasis invasiva fue del 32%, y entre los afectados por *C. albicans*, estos valores alcanzan el 44%.

### ***Candida tropicalis***

*C. tropicalis* es una de las especies más comunes entre las especies no *C. albicans* en pacientes pediátricos, frecuentemente aislada de cultivos de sangre y orina (11, 21, 47, 57,59). En nuestro estudio, fue la segunda especie en frecuencia en orinas de pacientes pediátricos (32 %) junto con *C. albicans*, pero fue aislada en baja frecuencia en hemocultivos.

Esta levadura tiene mayor potencial de diseminación entre individuos neutropénicos con enfermedad hematológica o receptores de médula ósea en comparación con otras especies (57). Según Kontoyiannis y col., entre las diferencias distintivas en la presentación y los factores de riesgo que distinguen las fungemias producidas por *C. tropicalis* y *C. albicans*, la primera se presenta en forma más persistente y conduce a estadías más prolongadas en UTI durante el curso de la infección (66,67). Esta persistencia de *C. tropicalis* se observó en este trabajo, en dos pacientes donde fue se obtuvieron aislamientos repetidos en muestras de orina en distintas ocasiones de *C. tropicalis* durante su internación.

### ***Candida glabrata***

*C. glabrata* ha sido considerada un saprófito no patógeno de la biota normal de individuos sanos, que raramente causaba infecciones graves en humanos. Sin embargo, tras el uso generalizado y en aumento de la terapia inmunosupresora, la frecuencia de infecciones causadas por esta levadura ha ido aumentando de manera significativa (68). En nuestro estudio se encontró solo en la orina de un paciente neonato. En relación a otros trabajos de pacientes pediátricos realizados anteriormente en nuestra región esta frecuencia fue menor (12,47). Esta especie ha sido informada como agente frecuente de infecciones urinarias junto a otras especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* (69–73). Existen evidencias que esta especie se adapta fácilmente a determinadas propiedades de la orina, como la osmolalidad y el pH (69).

Las infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar y con frecuencia son resistentes a muchas drogas azólicas, especialmente al FCZ. En consecuencia, las infecciones por *C.*

*glabrata* tienen una alta tasa de mortalidad en pacientes hospitalizados de alto riesgo (59,74). También existen evidencias que demuestran una rápida diseminación de las infecciones por esta levadura en los estos pacientes (19,68). *C. glabrata* complex es generalmente sensible a los derivados poliénos como nistatina y AMB, pero presenta sensibilidad disminuida al FCZ, droga de primera línea utilizada en el tratamiento de los pacientes en estos nosocomios (19). El tratamiento con azoles puede llevar al fracaso terapéutico en estos casos, es por lo tanto fundamental, el aislamiento e identificación de especies, a fin de detectar especies como estas al momento de instaurar la terapia antifúngica.

### ***Candida lusitaniae***

*Candida lusitaniae* es reconocida como un patógeno nosocomial emergente, principalmente entre pacientes graves e inmunodeprimidos. Una revisión realizada que incluye 55 casos de infecciones por esta levadura, reveló que la mayoría de las infecciones se producen en paciente relativamente jóvenes, siendo la funguemia el síndrome principal, y con menos frecuencia se informan casos de peritonitis, infecciones del tracto urinario y meningitis (75). En nuestro estudio se obtuvieron dos aislamientos de *C. lusitaniae* en muestras de orina de un pacientes neonatos. A pesar de ser poco frecuente, informada entre un 0,6 y 2,1 % en publicaciones realizadas en Argentina (6, 12,21), y hasta en un 4 % a nivel internacional, menor aún entre paciente pediátricos (17, 23,75), su interés clínico radica en su capacidad para desarrollar resistencia a la AMB, en especial durante el tratamiento con este fármaco.

### ***Candida guilliermondii***

*Candida guilliermondii* se puede encontrar formando parte de la microbiota humana y es considerada un patógeno emergente, que se presenta con una gran variabilidad en su frecuencia de aislamiento de acuerdo al país y la población en estudio (6, 9, 17, 21,76). Por ejemplo, en un estudio de candidemias realizado por Nucci y col. que incluye a 7 países de Latinoamérica, esta especie fue muy común en Honduras con una frecuencia de 20,7%, mientras que en países como Brasil y Colombia representó menos del 2% del total de los aislamientos. En este estudio, *C. guilliermondii* fue encontrada en el 18,5%, y se ha aislado principalmente en hemocultivos de pacientes neonatos prematuros. Esta especie ya ha sido previamente informada por nuestro grupo de investigación en esta región en hemocultivo de paciente oncológico (12) y en una muestra de cateter de un paciente neonate, y en ambos casos demostró ser sensible in vitro a los azoles y a la anfotericina B.

La importancia de esta especie radica en que ha sido informada como una levadura con capacidad de propagarse produciendo brotes nosocomiales y con sensibilidad disminuida a los azoles y equinocandinas (76–78), razón por la cual es importante su detección temprana. Se ha demostrado que la transmisión nosocomial se detiene tras un refuerzo de las medidas de control de infecciones (76). Por esta razón es importante su detección temprana para su control.

### ***Candida krusei***

*C. krusei* representa en general entre 1,5 al 4% de los aislamientos de *Candida* de hemocultivos, aunque la frecuencia de aislamiento puede disminuir cuando se estudian poblaciones pediátricas (6, 20,21,23), pero esta frecuencia puede aumentar en lugares

donde se utiliza FCZ como profilaxis (28). En este estudio esta especie representó el 6,34% del total de los aislamientos, aislada principalmente en muestras de orina y una de sangre. Estas levaduras se han aislado principalmente de hemocultivos y también ha encontrado en muestras de cateteres venoso y en orina de pacientes internados (71, 73,79). Los aislamientos de *C. krusei* representan un gran problema debido a su resistencia intrínseca al FCZ y a que algunos autores la han reportado como un patógeno multirresistente a otras drogas como la AMB (80,81) y ambas constituyen las drogas de elección para el tratamiento de pacientes pediátricos hospitalizados.

### ***C. haemulonii***

*C. haemulonii* es un complejo de especies comúnmente informada como multiresistente, a la anfotericina B y al fluconazol, como patógeno emergente causante de fungemias, principalmente en pacientes oncológicos.

### **Levaduras en sangre**

La candidemia, es decir, la presencia de especies de *Candida* en la sangre, es la causa principal de infecciones fúngicas invasoras en niños hospitalizados, y después de la bacteriemia por *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Staphylococcus aureus* y/o enterococos, es la tercera o cuarta causa más común de infección del torrente circulatorio en el mundo (54). En este estudio, los aislamientos de levaduras de hemocultivos representaron más del 50 % del total de las muestras.

El aislamiento de una levadura en sangre nunca debe interpretarse como un contaminante y debe incitar la búsqueda de la fuente, debe resolverse rápidamente debido a que esta infección tiene elevada tasa de mortalidad, principalmente entre pacientes pediátricos (82–84). En nuestro país, la mortalidad de pacientes con candidemia se reporta entre un 20-30% (21,85). Aunque no existen datos específicos en pacientes pediátricos, estos valores observados de mortalidad atribuida a las candidemias, enfatizan la necesidad urgente de detectar y diagnosticar, e instaurar tratamiento a las infecciones del torrente circulatorio en estos pacientes de riesgo. Por otro lado, existe una relación estadísticamente significativa ya probada entre la candidemia pediátrica relacionada con mayores costos de hospitalización y prolongación de la permanencia hospitalaria de los pacientes (78, 79). En el presente estudio, en tres pacientes se aisló en forma persistente en más de una ocasión, y en otros dos la levadura fue aislada en el hemocultivo conjunto con otras levaduras en orina, confirmando la diseminación de la misma.

En general son cinco las especies responsables de más del 90% de candidemia en pacientes hospitalizados, entre ellas, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, y *C. krusei* (84). En este estudio, *C. parapsilosis* complex y *C. albicans* fueron las especies más frecuentes aisladas (29,6%), seguida por *C. guilliermondii* (18,5%). El papel predominante de *C. guilliermondii* en candidemias ha sido observado en otras investigaciones, aunque son escasos en los que supera en número a *C. tropicalis*. Esta especie es considerada un oportunista emergente, cuya frecuencia ha ido incrementando en los últimos años en pacientes internados (28, 81,86). Esta especie es conocida porque ha sido reportada con sensibilidad disminuida frente a la anfotericina B, fluconazol y las equinocandinas, aunque los reportes en nuestra región la reportan como una especie sensible (12, 24,28).

## *Levaduras en orina*

La presencia de candiduria en pacientes hospitalizados es un hallazgo frecuente de gran relevancia clínica, con particular importancia en aquellos pacientes de UCI y en los pacientes sondados. Sin embargo, el valor de la recuperación de levaduras en orina es controvertido y no hay consenso acerca de qué parámetros son los adecuados para diferenciar entre contaminación, colonización e infección urinaria. El aislamiento de levaduras en la orina de pacientes sondados representa la mayor parte de las veces contaminación de sondas urinarias, puede corresponder a una colonización y sólo en raras oportunidades, infección. La candiduria se asocia a una mayor mortalidad entre estos pacientes, lo que determina la relevancia clínica de su detección (87). En nuestro estudio, los aislamientos de levaduras en orinas fueron los más frecuentes (25 de 52 muestras).

Numerosos autores confirman que el uso de catéteres urinarios es un factor de riesgo que contribuye al crecimiento de levaduras en orina y por consiguiente al desarrollo de funguria en pacientes internados (69). Una tesis realizada acerca de candidurias realizada en un hospital de Formosa, Argentina, demostró que el 37% de casos de las mismas estaban asociados al uso de sonda vesical (71,88). Otro estudio realizado por Passo y col., reveló que el 92,6% de los pacientes que habían desarrollado candiduria tenían catéteres urinarios permanentes (89). La recepción de la levadura derivada a nuestro laboratorio, y la escasez de los antecedentes de los pacientes enviados, dificultan disponer de datos como los relacionados a si el paciente se encontraba con sonda permanente o no, haciendo imposible determinar la relación entre el uso de sonda y la presencia de levaduras en orina. Solo podemos referir que las levaduras procesadas en este trabajo, son representativas de las muestras de orinas evaluadas, en cuyo caso fueron enviadas a nuestro departamento para su identificación y estudio de sensibilidad, pero nos limita para definir si se refiere a un caso de contaminación, colonización e infección urinaria.

La especie de *Candida* aislada con más frecuencia ha sido, clásicamente, *C. albicans*; sin embargo, en diversos trabajos se ha documentado el aumento en la incidencia de otras especies de este género (69, 71,90). En un estudio multicéntrico realizado por Kauffman y col. (73), donde se estudiaron candidurias de 861 pacientes, *C. albicans* ocupó el primer lugar con 51,8%, seguido por un 15,6%, 8%, 4% y 1% de aislados correspondientes a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* respectivamente. Pero en otros casos, algunas instituciones han identificado a *C. tropicalis* como la más frecuente aislado de hongos, mientras que en otros *C. glabrata* ha sido la especie dominante. En este estudio, *C. albicans* fue la especie más frecuente junto con *C. tropicalis* (32%). En una investigación de tesis realizada en la ciudad de Formosa entre pacientes pediátricos, *C. albicans* constituyó aproximadamente el 40% de los aislados, pero las levaduras no - *C. albicans* representaron el 58,7% del total de las levaduras donde la especie no *albicans* principal fue *C. tropicalis* (71). En otro estudio realizado en la Ciudad autónoma de Buenos Aires por Cornistein y col., el 67,2% de las especies halladas fueron *C. no - albicans* (*C. tropicalis*, 34,4%, *C. glabrata* 11,5%, *C. parapsilosis* 1,6%, *C. krusei* 0,8% , entre otras)(72).

El reconocimiento temprano y el inicio rápido de un tratamiento efectivo es un requisito necesario para el manejo exitoso de niños con infecciones fúngicas invasoras. La creciente diversidad de patógenos fúngicos en pacientes de alto riesgo, las diferencias en los perfiles de sensibilidad frente a los agentes antifúngicos disponibles y los crecientes reportes de resistencia exigen la identificación del agente infectante a nivel de especie y el estudio de su sensibilidad antifúngica. A pesar de las dificultades para obtener muestras apropiadas y/o suficientes, las duraciones de cultivo largas y los resultados falsos negativos, la microscopía y el cultivo de muestras apropiadas siguen siendo el estándar de referencia

para el diagnóstico micológico. Este trabajo constituye un importante aporte al conocimiento de la epidemiología de las infecciones causadas por levaduras entre pacientes pediátricos hospitalizados, necesarias para mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes.

## Conclusiones

- ✓ Este primer gran estudio de levaduras en pacientes pediátricos de nuestra región, mostró una elevada incidencia de infecciones en niños, una distribución típica de especies con *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* representando la mayoría de los episodios, similar a la observada en otros estudios de Latinoamérica. Sin embargo dejó en evidencia que en este grupo de pacientes, *C. parapsilosis* es la prevalente y ha desplazado como especie frecuente a *C. albicans*, siendo la primer especie aislada de la mayoría de las muestras procesadas.
- ✓ La amplia variedad de especies y géneros no *C. albicans* detectadas en este trabajo marca con énfasis la necesidad de identificación de especies como una ayuda para optimizar la terapia antifúngica y que nos permite conocer acerca de la preferencia de estas especies a nichos específicos de pacientes pediátricos.
- ✓ La identificación de especies tiene una gran utilidad clínica. El monitoreo sistemático de levaduras permite conocer cambios en la distribución de especies y detectar cepas resistentes, importante en los pacientes pediátricos cuyas opciones terapéuticas son escasas en nuestra región.
- ✓ Dado que estas especies poco comunes pueden encontrarse como patógenos oportunistas importantes entre los pacientes pediátricos, resulta fundamental documentar su comportamiento frente a los agentes antifúngicos y determinar probables opciones terapéuticas.

## Bibliografía

1. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 76–98.
2. Lopes Colombo A, Nucci M, Salomão R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; .
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133–163.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546–1554.
5. Consuelo M, Beck-Sague, William R, Jarvis and the, System NNIS. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States. n.d.
6. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS One* 2013; 8: e59373.
7. Blyth CC, Palasanthiran P, O'Brien T a. Antifungal therapy in children with invasive fungal infections: a systematic review. *Pediatrics* 2007; 119: 772–84.
8. Asticcioli S, Nucleo E, Perotti G, Matti C, Sacco L, Pagani L. *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: antifungal susceptibility and genotypic analysis. *New Microbiol* 2007; 30: 303–7.
9. Hazen K. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 462–78.

10. Chicella MF, Woodruff ED, Desai MM, Michael F Chicella, Eloise D Woodruff MMD. A Review of *Candida* Prophylaxis in the Neonatal Intensive. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2011; 16: 237–245.
11. Giusiano G, Mangiaterra M, Garcia Saito V, Rojas F, Gómez V, Díaz MC. Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from the bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients. *Chemotherapy* 2006; 52: 254–259.
12. Giusiano G, Mangiaterra M, Saito VG, Rojas F, Gómez V, Díaz MC. Etiology of fungaemia and catheter colonisation in Argentinean paediatric patients. *Mycoses* 2006; 49: 49–54.
13. Mondal S, Mondal A, Pal N, Banerjee P, Kumar S, Bhargava D. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of *Candida*. *J Inst Med* 2013; 35: 45–49.
14. Riera F, Medeot M, Sartori L, Bergallo C, Minoli J, Vilchez V, et al. [Candidemia epidemiology in Cordoba Argentina. Surveillance study of five institutions]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2014; .
15. Santos PE, Córdoba S, Carrillo-Muñoz A, Rodero L, Rubeglio E, Soria M. Epidemiología de las fungemias en un hospital pediátrico de alta complejidad. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 200–202.
16. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP De, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 401–5.
17. Iatta R, Caggiano G, Cuna T, Montagna T, Caggiano RG, Montagna TCMT. Antifungal Susceptibility Testing of a 10-year Collection of *Candida* spp . Isolated from Patients with Candidemia. *Clin Microbiol Rev* 2016; 9478: 6–11.
18. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: Results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis* 2012; .
19. Torres-Rodríguez JM. *Candida glabrata*: un patógeno emergente, in: Control Calid. SEMC, 1993; : pp. 1–7.
20. Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gomez V. Azole resistance in neonatal intensive care units in Argentina. *J Chemother* 2005; 17:.
21. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43: 176–85.
22. Dick JD. Fatal Disseminated Candidiasis Due to Amphotericin-B-Resistant *Candida guilliermondii*. *Ann Intern Med* 1985; 102: 67.
23. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A Prospective Observational Study of Candidemia : Epidemiology , Therapy , and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clin Infect Dis* 2003; 0006: 0–9.
24. Giusiano G, Mangiaterra M, Rojas F, Gomez V. Azole resistance in neonatal intensive care units in Argentina. *J Chemother* 2005; .
25. Tiraboschi IN, Carnovale S, Benetucci A, Fernández N, Kurlat I, Foccoli M, et al. Brote de candidemia por *Candida albicans* en neonatología. 2007; 263–267.
26. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 1119–1124.
27. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 682–700.
28. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* 2014; .
29. Human Fungal Pathogen Identification, Springer New York, New York, NY, 2017; .
30. Caballero-Trejo A, Aguirre-Morales CE, Gonzalez-Gonzalez GM, Cortes-Palma D, Miranda-Novales MG. Colonization by *Candida* in a neonatal intensive care unit. *Colon Por Candida En Una Unidad Cuid Intensivos Neonatales* 2014; .
31. Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 336–341.
32. Nucci M, Anaissie E. Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut? *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1959–1967.
33. Cole GT, Halawa AA AE. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 1996; .
34. Negroni R, Arechavala DA, Giusiano GE. Apuntes de Micología Médica. 2013; .
35. Cercenado Emilia CR. Procedimientos en Microbiología Clínica. *SeimcOrg* 2008; 40.
36. Pana ZD, Roilides E, Warris A, Groll AH, Zaoutis T. Epidemiology of Invasive Fungal Disease

- in Children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2017; 6: S3–S11.
37. Almeida AA de, Mesquita CSS, Svidzinski TIE, Oliveira KMP de. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 335–339.
  38. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida* orthopsilosis and *Candida* metapsilosis spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; .
  39. Tavanti A, Davidson AD, Gow N A R, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida parapsilosis* Groups II and III. *Society* 2005; .
  40. Jitsurong S, Kiamsiri S, Pattararangrong N. New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1993; .
  41. Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff T, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: Epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* 2003; .
  42. Raymond J, Aujard Y. Nosocomial Infections in Pediatric Patients A European, Multicenter Prospective Study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 260–263.
  43. Zaoutis TE, Berlin JA, Walsh TJ, Chu J, Argon J, Feudtner C. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. *Clin Infect Dis* 2005; .
  44. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Neonates: The Experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; .
  45. Benjamin DK, DeLong E, Cotten CM, Garges HP, Steinbach WJ, Clark RH. Mortality following blood culture in premature infants: Increased with Gram-negative bacteremia and candidemia but not Gram-positive bacteremia. *J Perinatol* 2004; .
  46. Blyth CC, Palasanthiran P, O'Brien TA. Antifungal Therapy in Children With Invasive Fungal Infections: A Systematic Review. *Pediatrics* 2007; 119: 772–784.
  47. Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gómez V. Yeasts species distribution in Neonatal Intensive Care Units in northeast Argentina. *Mycoses* 2004; 47: .
  48. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, et al. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2004; .
  49. Zepelin MB Von, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Groß U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: Results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* 2007; .
  50. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clin Infect Dis* 2009; .
  51. Milici ME, Maida CM, Spreghini E, Ravazzolo B, Oliveri S, Scalise G, et al. Comparison between disk diffusion and microdilution methods for determining susceptibility of clinical fungal isolates to caspofungin. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3529–33.
  52. Singh R, Parija SC. *Candida parapsilosis*: An emerging fungal pathogen. *Indian J Med Res* 2012; .
  53. Singh N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect* 2001; .
  54. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *ClinMicrobiolRev* 2008; .
  55. Ruiz L da S, Khouri S, Hahn RC, Silva EG da, Oliveira VKP de, Gandra RF, et al. Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in Children's Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susceptibility. *Mycopathologia* 2013; .
  56. Neu N, Malik M, Lunding A, Whittier S, Alba L, Kubin C, et al. Epidemiology of candidemia at a children;s hospital, 2002 to 2006. *Pediatr Infect Dis J* 2009; .
  57. Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, Monfardini LP de A, Cunha AKB, Rady P, et al. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; .
  58. Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gómez V. Yeasts species distribution in Neonatal Intensive Care Units in northeast Argentina. *Mycoses* 2004; .
  59. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 288–305.

60. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; .
61. Pemán J, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: Results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; .
62. Asbeck EC Van, Clemons K V., Stevens DA. *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility *Candida parapsilosis*: A review van Asbeck et al. *Crit Rev Microbiol* 2009; .
63. Huang YC, Lin T-Y, Leu HS, Peng HL, Wu J-H, Chang HY. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: Clinical implications and genotyping analysis. *Infection* 1999; .
64. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* 2005; .
65. Cassone A, Bernardis F De, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, et al. Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis* 1995; .
66. Cantón E, Viudes A, Pemán J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol* 2001; .
67. Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, et al. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1676–1681.
68. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; .
69. Sobel JD, Fisher JF, Kauffman CA, Newman CA. *Candida* urinary tract infections - Epidemiology. *Clin Infect Dis* 2011; .
70. Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. *Rev Argent Microbiol* 2004; .
71. Alvarez C. Candiduria en una UCI pediátrica. Agentes etiológicos, perfil de sensibilidad y capacidad de formación de biopelícula, Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina, 2018; .
72. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, Castillo M del. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31: 380–384.
73. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, et al. Prospective Multicenter Surveillance Study of Funguria in Hospitalized Patients. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 14–18.
74. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: Antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans* *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother* 2003; .
75. Hawkins JL, Baddour LM. *Candida lusitanae* Infections in the Era of Fluconazole Availability. *Clin Infect Dis* 2003; .
76. Masala L, Luzzati R, Maccacaro L, Antozzi L, Concia E, Fontana R. Nosocomial Cluster of *Candida guilliermondii* Fungemia in Surgical Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 686–688.
77. Medeiros EAS, Lott TJ, Colombo AL, Godoy P, Coutinho AP, Braga MS, et al. Evidence for a Pseudo-Outbreak of *Candida guilliermondii* Fungemia in a University Hospital in Brazil. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 942–947.
78. Yagupsky P, Dagan R, Chipman M, Goldschmied-Reouven A, Zmora E, Karplus M. Pseudoutbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis* 1991; .
79. Iatta R, Figueredo LA, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections. *J Med Microbiol* 2014; 63: 1467–73.
80. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 120–128.
81. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4419–4431.
82. Singhi S, Deep A. Invasive candidiasis in pediatric intensive care units. *Indian J Pediatr* 2009; .
83. Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: Update on current guidelines. *Mycoses* 2015; .



84. Mantadakis E, Pana ZD, Zaoutis T. Candidemia in children: Epidemiology, prevention and management. *Mycoses* 2018; 61: 614–622.
85. Rodero L, Davel G, Sorial M, Vivotl W, Córdoba S, Canteros C, et al. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2005; .
86. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang S-C, et al. *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3551–3556.
87. Álvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med* 2003; .
88. Maldonado I, Arechavala A, Guelfand L, Relloso S, Garbasz C. Infecciones urinarias nosocomiales por levaduras. Estudio multicéntrico de 14 hospitales de la red de micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Rev Iberoam Micol* 2016; .
89. Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Lemos J de A, et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 925–928.
90. Heras-Cañas V, Ros L, Sorlózano A, Gutiérrez-Soto B, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Especies de levaduras aisladas en muestras de orina en un hospital regional de España. *Rev Argent Microbiol* 2015; 47: 331–334.

## SUMMARY

In the last years, there has been a significant increase in invasive fungal infections and a change in the frequency and diversity of the species involved. Little is known about the epidemiology, diagnosis, treatment of fungal infections in pediatric populations. Objective: to determine the frequency of isolated yeast species of hospitalized pediatric patients and neonates of intensive care units. **Materials and methods:** Between August 2016-2018, isolated yeasts obtained from clinical samples of pediatric patients were identified. **Results:** 61 yeasts were obtained from 48: 38 pediatric and 10 neonates. The most frequent species were *C. albicans* 28.6%, *C. tropicalis* 20.7%, *C. parapsilosis* 19%, *C. guilliermondii* 9.51%, *C. krusei* 6.34%. Genera as *Cryptococcus* sp. (4.75) and *Trichosporon* sp (1.58%) were isolated too. Yeasts were obtained from 25 urine, 27 blood cultures. In blood cultures *C. parapsilosis* and *C. albicans* were more frequently species, and *C. albicans* and *C. tropicalis* in urine samples. **Discussion:** The diversity of non-*C. albicans* species and genera detected emphasizes the needing to identify clinical simple isolates. Monitoring of yeasts allows to know changes in the distribution of species and detect susceptible isolates to clinical antifungals, important because therapeutic options are scarce in our region.

# IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS REGULADORES DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE CÉLULAS TCD4 COMO MARCADORES DE RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD EN LA TUBERCULOSIS HUMANA

Agustín Rolandelli<sup>1</sup>; Joaquín M. Pellegrini<sup>1</sup>; Nicolás O. Amiano<sup>1</sup>; María P. Morelli<sup>1</sup>; Florencia A. Castello<sup>1</sup>; Nancy L. Tateosian<sup>1</sup>; Alberto Levi<sup>2</sup>; Nicolás Casco<sup>2</sup>; Domingo J. Palmero<sup>2</sup> y Verónica E. García<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN), CONICET-Universidad de Buenos Aires, 4º piso, Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria (C1428EGA), Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup> División Tisioneumonología Hospital F.J. Muñiz, Uspallata 2272, (C1282AEN), Buenos Aires, Argentina

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), enfermedad causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), continúa siendo un importante problema para la salud. Los últimos datos de la OMS reportaron aproximadamente 10.4 millones de casos y 1.3 millones de muertes de TB en el 2016[1]. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mtb*. Sin embargo, la infección por *Mtb* no es suficiente para causar TB en la mayoría de las personas. Numerosos estudios comprueban el rol de la genética del hospedador en la resistencia/susceptibilidad a la TB[2]. Se ha demostrado que los factores genéticos contribuyen al desarrollo de la TB, con una heredabilidad (proporción de la variación fenotípica en una población atribuible a componentes genéticos) estimada que oscila entre el 36% y el 70%[3].

El enfoque más empleado para investigar la susceptibilidad genética a la TB es mediante estudios de asociación de genes candidatos. Los estudios poblacionales de asociación casos-control se basan en comparar la frecuencia de alelos y genotipos de un marcador específico presente en el gen candidato entre casos no relacionados (individuos enfermos) y controles (individuos sanos) cuando el equilibrio de Hardy Weinberg (HW) se mantiene[4]. Los SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) son la “marca genética de susceptibilidad” elegida en estudios de caso-control, debido a que son abundantes en el genoma, poco polimórficos, fáciles y económicos para caracterizar. Además, se cree que los SNPs son la verdadera fuente de variabilidad entre los seres humanos, pudiendo tener consecuencias funcionales según su localización en el genoma[5].

Entre todos los genes que participan en la respuesta inmune contra las enfermedades infecciosas, las citoquinas y otros genes encargados de desencadenar y/o controlar la respuesta inflamatoria desempeñan un papel crucial, convirtiéndose en los candidatos ideales para estudios de asociación en enfermedades complejas, como la TB. Así, teniendo en cuenta la importancia de las células Th17 (secretoras de IL-17A e IL-17F) en la respuesta inmune contra *Mtb*[6, 7] y que previamente demostramos una asociación del SNP rs2275913 del gen de la IL-17A con la TB en Argentina[8], en el presente trabajo se determinó si el SNP rs763780 (T→C) del gen de la IL-17F podría estar asociado con la susceptibilidad y la severidad de la enfermedad en nuestro país. También, considerando

que la sustitución de bases de dicho SNP provoca un cambio de aminoácidos en la secuencia proteica de la IL-17F y la torna no funcional[9], se evaluó el significado funcional del polimorfismo a través de la correlación con parámetros clínicos y con ensayos funcionales *ex vivo*.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### *Características demográficas de las poblaciones en estudio.*

Las características demográficas de las poblaciones de dadores sanos (DS) y pacientes con TB reclutadas se detallan en la **Tabla 1**. No se observaron diferencias significativas en la distribución de las edades, ni respecto al origen étnico entre los individuos que integraban ambas poblaciones. Sí se hallaron diferencias respecto al porcentaje de individuos de cada sexo reclutados en las poblaciones en estudio, pero dentro de cada población no hubo diferencias en cuanto a la distribución de los genotipos por sexo. Así, ni la edad, el sexo o el origen étnico son factores que impactan en la distribución de las frecuencias alélicas o genotípicas del SNP rs763780 en las poblaciones estudiadas.

**Tabla 1. Características demográficas de las poblaciones de DS y de pacientes con TB estudiadas**

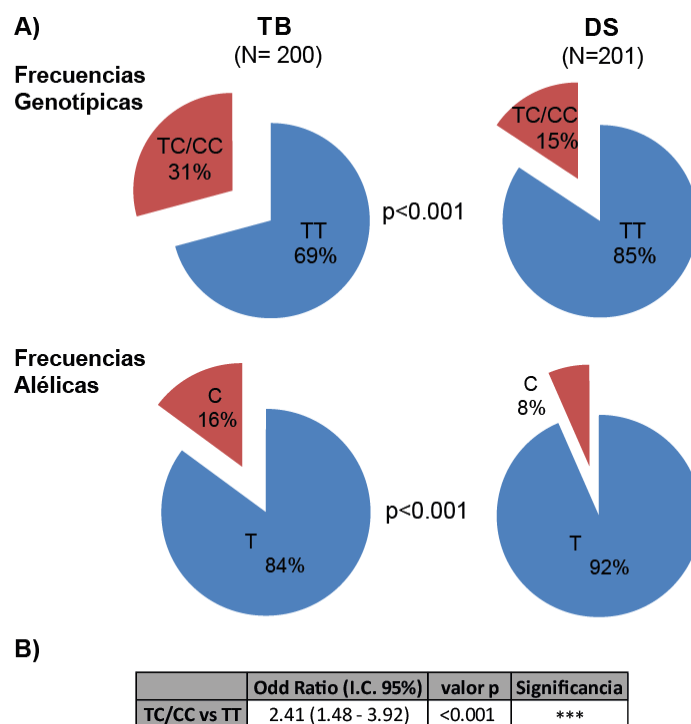
		DS	Pacientes con TB	valor p
<b>n</b>		201	200	
<b>Edad</b>		33.6 ± 1.1 años	33.1 ± 1.1 años	0.13
<b>Origen étnico</b>	<b>Caucásicos</b>	69.44%	63.64%	0.36
	<b>Nativos Americanos</b>	30.56%	36.36%	
<b>Sexo</b>	<b>Varones</b>	38.50%	73.10%	<0.001
	<b>Mujeres</b>	61.50%	26.90%	

### *Caracterización poblacional de las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs763780 en las poblaciones de DS y de pacientes con TB.*

Los gráficos de torta representando la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas encontradas mediante la genotipificación por ARMS-PCR en la población de DS y pacientes con TB se muestran en la **Figura 1A**. Ambas poblaciones se encuentran en equilibrio HW. El análisis estadístico por Chi-cuadrado reveló que tanto la distribución de frecuencias genotípicas como alélicas para el SNP rs763780 del gen de la IL-17F son diferentes en ambas poblaciones, siendo el alelo C y los genotipos TC/CC los que se hallaron en mayor proporción en la población de TB. Es importante resaltar que no se encontró ningún individuo portador del genotipo CC en la población de DS, y sólo 3 individuos con este genotipo pertenecientes a la población de pacientes con TB, por lo que los individuos se agruparon en portadores (genotipo TC/CC) o no portadores (genotipo TT) del alelo C. Además, al comparar a los individuos portadores del alelo C contra los TT (relativizando a este último genotipo), se obtuvo un valor de *odd ratio* de 2.41 ( $p < 0.001$ ), lo cual estima que cada 10 individuos TT que padecen TB hay alrededor de 24 individuos (2.41 veces más) portadores del alelo C que están enfermos (**Figura 1B**). En conjunto, estos resultados demuestran una asociación entre el alelo C y los genotipos TC/CC del SNP rs763780 del gen de la IL-17F con una mayor frecuencia de

individuos enfermos, lo que podría significar que este SNP es un marcador de susceptibilidad a la TB en Argentina.

**Figura 1. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs763780 en la población de DS y de pacientes con TB en Argentina.**

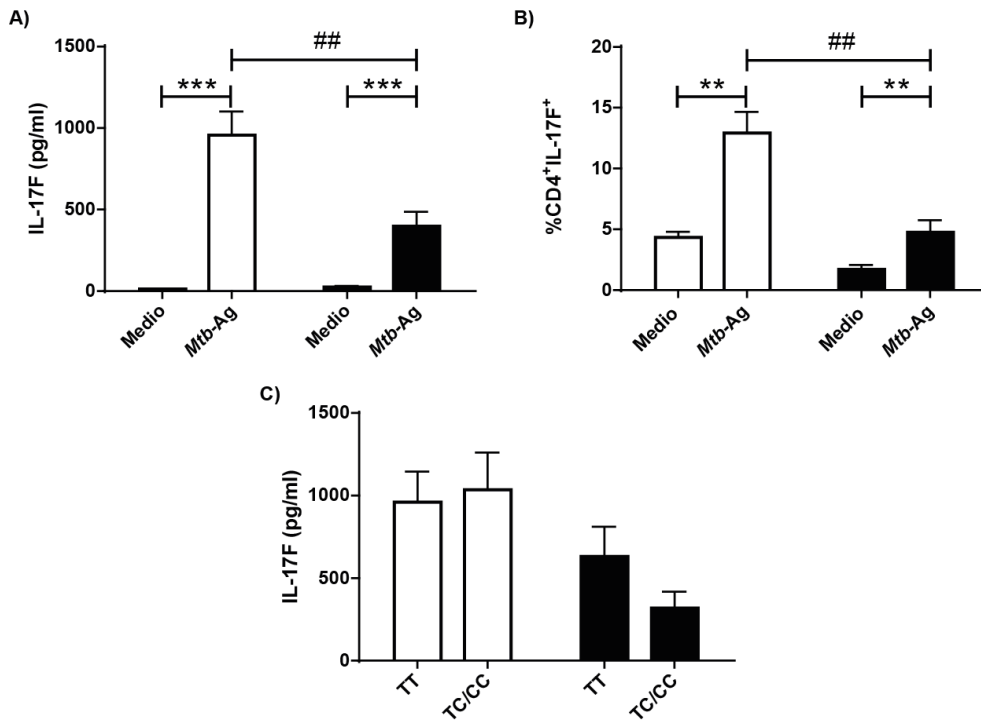


*Producción de IL-17F por CMSP estimuladas con Mtb-Ag e impacto de las variantes genotípicas del SNP rs763780 sobre dicha secreción.*

Hasta el momento, son escasos los estudios que evalúan el rol de la IL-17F en la inmunidad frente a *Mtb*. Se ha reportado que la estimulación de sangre entera con antígenos específicos de *Mtb* genera un aumento en la producción de IL-17F en LTBI en comparación con pacientes con TB; y que la producción de IL-17F por células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT) durante la TB es mayor en el sitio de infección en comparación con los niveles detectados en la periferia [10, 11]. Sin embargo, se desconoce cuáles son los niveles de IL-17F secretados por parte de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas, si hay diferencias en la producción de esta citoquina entre DS y pacientes con TB y si las variantes del SNP rs763780 influyen en la producción de dicha citoquina. Se observó que la estimulación por 5 días con un lisado de *Mtb* (*Mtb*-Ag) indujo un aumento significativo en la secreción de IL-17F tanto en DS como en pacientes con TB, en comparación con las CMSP sin estimular. Más aún, dicha inducción fue significativamente mayor en las CMSP de DS (**Figura 2A**). A su vez, se encontró que el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IL-17F aumentó significativamente en las CMSP estimuladas por 4 días con *Mtb*-Ag tanto en DS como en pacientes con TB, siendo estos últimos los que mostraron niveles significativamente menores (**Figura 2B**). Sin embargo, al discriminar a los DS y a los pacientes según su genotipo, no se encontraron diferencias en cuanto a la secreción de IL-17F (**Figura 2C**). Estos resultados sugieren que la IL-17F podría cumplir un rol en la inmunidad frente a

*Mtb*, ya que es producida por las CMSP estimuladas con antígenos de la bacteria, y de manera diferencial entre DS y pacientes con TB. Además, si bien no hay diferencias entre la producción de IL-17F por parte de las CMSP estimuladas entre los distintos portadores de las variantes del rs763780, los individuos portadores de la variante C podrían montar una respuesta inmune diferente en comparación con los individuos TT, ya que codifican para una proteína no funcional que actúa como un antagonista natural de la IL-17F[9].

**Figura 2. Producción de IL-17F por CMSP de en el contexto de la TB e impacto de las variantes genotípicas del SNP rs763780.**



*Relación entre las variantes genotípicas del SNP rs763780 y parámetros inmunológicos y clínicos en la TB.*

Para investigar la hipótesis del SNP rs763780 como marcador de susceptibilidad a la TB, se estudió a la población de DS en búsqueda de otros parámetros inmunológicos que permitan justificar una menor protección frente a la bacteria (**Tabla 2**). Se observaron diferencias tanto en la secreción de IFN- $\gamma$  como en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de esta citoquina por parte de CMSP luego de 5 días de estimulación, siendo los DS portadores del alelo C los que muestran los menores niveles. También, se detectaron porcentajes de linfocitos T CD3<sup>+</sup> expresando SLAM e índices de proliferación celular significativamente menores en las CMSP de estos DS en comparación con los DS portadores del genotipo TT. Estos resultados avalan la hipótesis que surge del análisis de las frecuencias genotípicas, dado que estos DS portadores del alelo C para el SNP rs763780, podrían generar una respuesta inmune menos efectiva frente a un primer contacto con la bacteria.

Luego, se planteó como nueva hipótesis que también habría diferencias en parámetros inmunológicos de severidad de la TB entre pacientes con TB portadores o no del alelo C, que permitirían considerar a esta variante genética como un marcador de severidad de la enfermedad. Para analizar esta teoría, como primera medida se determinaron ciertos parámetros inmunológicos en pacientes con TB, discriminados por genotipos (**Tabla 2**). Los niveles detectados de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo, luego de 5 días de

estimulación, fueron significativamente menores en los pacientes portadores del alelo C en comparación con los pacientes portadores del genotipo TT. Interesantemente, se observó además la mayor producción de IL-17A y el mayor porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17A en estos pacientes, resultados que avalan la hipótesis planteada sobre el alelo C del SNP rs763780 como marcador de mayor severidad de la TB, considerando los resultados previos de nuestro grupo de investigación[12]. También, se evidenció que las CMSP de estos individuos muestran el menor índice de proliferación en comparación con los pacientes portadores del genotipo TT.

**Tabla 2. Relación entre las variantes genotípicas del SNP rs763780 y ciertos parámetros inmunológicos.**

Parámetros inmunológicos	Genotipos del SNP rs763780:		Valor <i>p</i>
	TT	TC/CC	
<b>Dadores Sanos (n=26)</b>			
IFN- $\gamma$ en sobrenadantes de cultivo (pg/ml)	23362 $\pm$ 4775	10422 $\pm$ 3305	<b>0.031</b>
% células T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	16.39 $\pm$ 2.06	7.30 $\pm$ 2.60	<b>0.018</b>
IL-17A en sobrenadantes de cultivo (pg/ml)	238.2 $\pm$ 57.57	284.6 $\pm$ 108.8	0.575
% células T CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup>	2.35 $\pm$ 0.59	3.51 $\pm$ 1.72	0.762
% células T CD3 <sup>+</sup> SLAM <sup>+</sup>	23.48 $\pm$ 3.32	11.05 $\pm$ 3.37	<b>0.049</b>
Índice de proliferación celular	14.25 $\pm$ 2.41	5.66 $\pm$ 1.65	<b>0.024</b>
<b>Pacientes con TB (n=30)</b>			
IFN- $\gamma$ en sobrenadantes de cultivo (pg/ml)	12300 $\pm$ 2306	7228 $\pm$ 3488	<b>0.003</b>
% células T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	16.57 $\pm$ 2.06	14.06 $\pm$ 2.60	0.881
IL-17A en sobrenadantes de cultivo (pg/ml)	245.7 $\pm$ 45.36	482.9 $\pm$ 121.2	<b>0.024</b>
% células T CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup>	3.54 $\pm$ 0.78	8.88 $\pm$ 2.40	<b>0.047</b>
% células T CD3 <sup>+</sup> SLAM <sup>+</sup>	5.23 $\pm$ 0.60	4.08 $\pm$ 0.53	0.649
Índice de proliferación celular	9.34 $\pm$ 0.78	3.66 $\pm$ 0.46	<b>0.032</b>

Finalmente, para corroborar la hipótesis de una mayor severidad de la TB en aquellos pacientes portadores del alelo C del SNP rs763780, se determinó la posible asociación entre los distintos genotipos del SNP en estudio con ciertos parámetros clínicos de severidad a la TB (**Tabla 3**). Se encontraron diferencias significativas en el recuento de bacilos en muestra de esputos, siendo la mayoría de los pacientes portadores del alelo C los que mostraron los recuentos más elevados de bacilos en esputo; de manera opuesta a los pacientes portadores del genotipo TT que en su mayor parte poseen pocos o ningún bacilo en esputo. Así, estos resultados complementan las evidencias anteriormente descriptas sobre una mayor severidad de la TB en estos pacientes.

**Tabla 3. Relación entre las variantes genotípicas del SNP rs763780 y parámetros clínicos de severidad de la TB.**

Población de pacientes con TB	Genotipos del SNP rs763780:		valor p
	TT	TC/CC	
<b>Recuento hematológico (n= 76)</b>			
Leucocitos (cel./ml)	10105 (± 449.6)	9113 (± 540.4)	0.40
Linfocitos (cel./ml)	1576 (± 71.70)	1394 (± 115.3)	0.16
Monocitos (cel./ml)	874.7 (± 46.81)	716.2 (±76.09)	0.09
Neutrofilos (cel./ml)	6810 (± 435.8)	7423 (± 1100)	0.76
<b>Bacilos en esputo (n=173)</b>			
BAAR- o BAAR+	74 (60.66%)	19 (37.25%)	<b>&lt;0.01</b>
BAAR++ o BAAR+++	48 (39.34%)	32 (62.75%)	
<b>Lesiones radiológicas (n=163)</b>			
Leves o Moderadas	52 (44.07%)	18 (40.00%)	0.72
Severas	66 (55.93%)	27 (60.00%)	
<b>Meses desde inicio de síntomas (n=118)</b>	2.89 (± 0.28)	2.66 (±0.29)	0.85

Todos estos resultados, a nivel genético, inmunológico y clínico, demuestran que **el alelo C y los genotipos TC/CC del SNP rs763780 podrían ser considerados como marcadores de mayor susceptibilidad y severidad de la TB en Argentina.**

## BIBLIOGRAFÍA

- World Health Organization. 2016 <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>.
- Abel, L., *et al.* "Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci". 2014. **369**.
- Marks, S.M., *et al.* "Am J Respir Crit Care Med". 2000. **162**.
- Moller, M., *et al.* "FEMS Immunol Med Microbiol". 2010. **58**.
- Pacheco, A.G., *et al.* "Dis Markers". 2009. **27**.
- Lyadova, I.V., *et al.* "Mediators Inflamm". 2015. **2015**.
- Torrado, E., *et al.* "Cytokine Growth Factor Rev". 2010. **21**.
- Rolandelli, A., *et al.* "Sci Rep". 2017. **7**.
- Kawaguchi, M., *et al.* "J Allergy Clin Immunol". 2006. **117**.
- Kamakia, R., *et al.* "Int J Tuberc Lung Dis". 2017. **21**.
- Jiang, J., *et al.* "Sci Rep". 2016. **6**.
- Jurado, J.O., *et al.* "J Leukoc Biol". 2012. **91**.



## ABSTRACT

Host genetic factors contribute to the development of tuberculosis (TB), a disease caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the "genetic susceptibility mark" chosen in case-control studies. Taking into account the importance of Th17 cells in the immune response against *Mtb*, in the present investigation we studied the association of the IL-17F rs763780 (T→C) SNP with the susceptibility to TB and the severity of the disease in Argentina. The C allele and individuals carrying this allele (TC/CC) were found in a higher proportion in the TB patient population. Moreover, *Mtb*-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors (HD) carrying the C allele displayed the lowest percentage of CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$ , the lowest SLAM expression in CD3<sup>+</sup> T lymphocytes and the lowest proliferation index, indicating that this individuals would mount a poorer immune response against the bacterium. Interestingly, *Mtb*-stimulated PBMCs from HD showed increased production of IL-17F in comparison with TB patients, with no differences detected among individuals carrying the different SNP variants. Besides, within the TB patient population, lower levels of secreted IFN- $\gamma$  and proliferation index, and higher levels of secreted IL-17A and percentage of IL-17A producing CD4<sup>+</sup>T cells were detected in *Mtb*-stimulated PBMCs from patients carrying the C allele. Additionally, we evidenced that the majority of these TB patients had a greater number of sputum bacilli, as compared to TT patients. Therefore, the C allele of the IL-17F rs763780 SNP is proposed as a marker of TB susceptibility, and related to higher disease severity in Argentina.

# EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA MICROPAPILAR INVASOR, DE SU EXPRESIÓN DE MUCINA 4 Y DE SU VALOR PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO

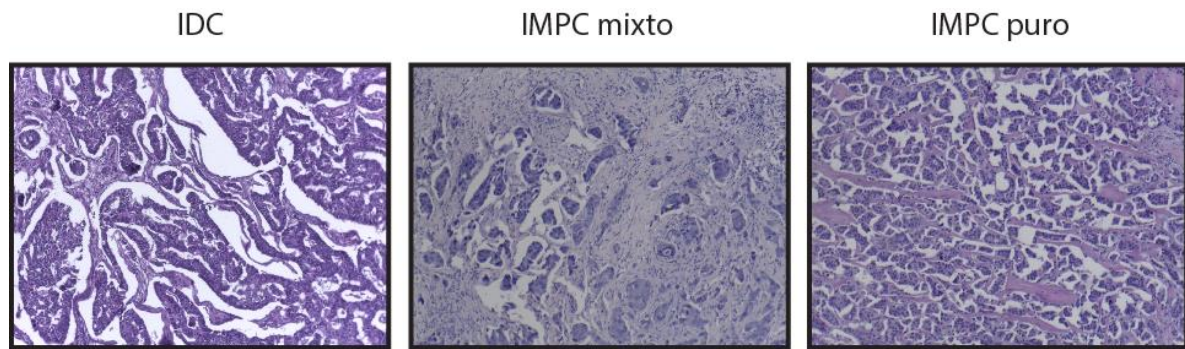
María Florencia Mercogliano<sup>1</sup>, Gloria Inurrigarro<sup>2</sup>, Mara De Martino<sup>1</sup>,  
Roxana Schillaci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, <sup>2</sup>Servicio de Patología, Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires, Argentina

## Introducción

El carcinoma invasor micropapilar de mama (IMPC por sus siglas en inglés, *Invasive Micropapillary Carcinoma*, **Figura 1**) se define como una variante poco frecuente de carcinoma invasivo caracterizada por presentar cúmulos de células tumorales con una formación *inside-out*, separadas entre sí por el estroma interviniente. Este subtipo conforma el 6% de todos los cánceres de mama [1,2]. Este subtipo histológico fue descrito originalmente en 1980 [3]. El IMPC posee un fenotipo angioinvasivo que permite su diseminación por los vasos sanguíneos, lo que conlleva un mayor número de metástasis en ganglios linfáticos y un peor resultado clínico para el paciente respecto de otros subtipos histológicos [4,5]. Además, esta entidad histológica presenta más frecuentemente expresión de HER2 y receptores de estrógenos (RE), y se ha encontrado subtipo micropapilar en tumores luminal A, luminal B (tanto HER2+ o HER2-) y en el HER2+ no luminal [3,4]. A pesar que el IMPC constituye un subtipo histológico de cáncer de mama *per se* y se lo conoce como IMPC puro (**Figura 1**), lo más común es que se encuentre asociado al carcinoma ductal invasivo (IDC por sus siglas en inglés *Invasive Ductal Carcinoma*) donde el componente micropapilar es variable y se lo denomina IMPC mixto (**Figura 1**).

Sumado a esto el IMPC puro presenta fenotipos y patrones de aberraciones genómicas similares a los que exhibe el IMPC mixto [6]. En línea con esta evidencia, ha sido reportado previamente que la incidencia de diseminación a ganglios linfáticos es independiente de la cantidad de micropapilas presentes en el tumor. Es decir, una vez que el componente micropapilar está presente, el comportamiento y el resultado clínico son similares para pacientes que tengan IMPC independientemente de si éste es puro o mixto [1,5].



**Figura 1. Microfotografías representativas de los subtipos IDC, IMPC mixto y puro.** Se muestra en el panel fotografías para ejemplificar los subtipos histológicos mencionados. A la izquierda se encuentra el IDC. El IMPC es un subtipo histológico en sí y se lo denomina IMPC puro (derecha), pero la mayoría de las veces el componente micropapilar se encuentra asociado a IDC y se lo conoce como IMPC mixto (medio) El subtipo histológico IMPC, puro o mixto, se caracteriza por presentar cúmulos de células tumorales con una formación *inside-out* separadas por el estroma interviniente, lo que genera el aspecto de micropapila que le da su nombre.

A pesar de la importancia del subtipo micropapilar es frecuente que los patólogos no reporten su presencia, esto se debe a que es relativamente complicado de identificar sumado a que no existe un conjunto de marcadores fiables para determinar su presencia. Por todo lo enumerado hasta ahora es vital reportar la presencia de IMPC, incluso cuando esta sea sutil, y además, sería interesante contar con un biomarcador para detectar su presencia fehacientemente.

El cáncer de mama HER2+ se caracteriza por un comportamiento muy agresivo [7]. Además, estos pacientes son tratados con trastuzumab y quimioterapia [8] pero el 42% de los pacientes tratados con trastuzumab en adyuvancia y el 27% tratados en neoadyuvancia progresan a la enfermedad [9,10].

Previamente hemos demostrado que la expresión de MUC4 inducida por TNF $\alpha$  a través de NF- $\kappa$ B enmascara el epítipo del HER2 reconocido por el trastuzumab impidiendo su acción terapéutica, conformando un novedoso mecanismo de resistencia al anticuerpo monoclonal. Más aún comprobamos que MUC4 es un biomarcador independiente de mala respuesta al trastuzumab administrado en adyuvancia en pacientes con cáncer de mama HER2+[11].

En la literatura, ya había sido descrito que MUC4 confiere propiedades antiadhesivas a las células de cáncer de mama[12] y por otro lado se ha reportado la asociación entre la presencia de TNF $\alpha$  y la densidad de vasos sanguíneos en tumores IMPC[13]. Dado que el estudio de nuestra cohorte de pacientes HER2+ reveló varios casos de IMPC y debido a MUC4 e IMPC comparten características similares[12,13] decidimos explorar la expresión de MUC4 en el subtipo histológico micropapilar en nuestra cohorte de cáncer de mama HER2+. Más aún, evaluamos si la expresión de dicha glicoproteína poseía alguna relevancia y si podría ser utilizada como biomarcador de dicho subtipo histológico.

## **Materiales y Métodos**

### ***Pacientes***

El estudio se realizó sobre 86 muestras de tejidos incluidas en parafina de pacientes con cáncer de mama ductal invasivo HER2+ obtenidas previamente a su tratamiento con trastuzumab en adyuvancia. Los especímenes provinieron del Hospital General de Agudos “Juan A. Fernández” y del Instituto de Oncología Henry Moore (CABA, Buenos Aires) colectados desde 2005 hasta 2014. El seguimiento clínico medio de la cohorte es de 30 meses (rango 0.5 – 9 años). Este estudio se realizó de acuerdo con lo establecido en la Declaración de Helsinki y los consentimientos informados fueron obtenidos de todos los pacientes, previo a la inclusión de los mismos. Los protocolos del estudio fueron aprobados por los Comités de Ética de las instituciones participantes. Los especímenes fueron anonimizados.

### ***Inmunohistoquímica***

Las tinciones fueron realizadas manualmente sobre cortes de parafina de 4  $\mu$ M, realizándose la recuperación antigénica en buffer de citrato de sodio 10 mM, pH 6, 0,05% Tween 20 durante 50 minutos a 92°C. Los cortes se incubaron por 16h a 4°C con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  (#9737, 1:100, Abcam) o MUC4 (1G8, 1:50, Santa Cruz). Luego, los cortes se incubaron con el sistema HRP (Vector Laboratories) y se desarrolló la actividad enzimática con 2,4-diaminobencidina (Cell Marque, Rocklin, CA, EE.UU).

Para puntuar las tinciones se utilizó un *score* de 0 a 3+: *Score* 0: sin marca a <30% de células con tinción débil; 1+: >30% de las células con marcación de débil a moderada; 2+: >50% de las células con marca moderada; 3+: tinción intensa de la mayor parte de la población epitelial. Los tumores fueron considerados positivos si exhibían un *score* de 2+ o 3+.

### ***Análisis estadístico***

La significancia estadística se analizó con el programa Statistical Package SPSS versión 15 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). El test  $\chi^2$  fue utilizado para analizar la asociación de MUC4 con las características clinicopatológicas de los pacientes. La probabilidad de supervivencia libre de enfermedad acumulada se calculó según el método de Kaplan-Meier y se analizó mediante el test log-rank. Para el análisis univariado se utilizó la regresión de riesgos de Cox. Se calculó el riesgo relativo (HR) y el intervalo de confianza (IC = 95%) para cada variable. Los  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## **Resultados**

Dado que la expresión de HER2 suele ser frecuentemente reportada en el subtipo IMPC, decidimos estudiar la incidencia y la relevancia clínica del mismo en pacientes con cáncer de mama HER2+. Para ello utilizamos nuestra cohorte compuesta por 86 pacientes con cáncer de mama HER2+ tratados con trastuzumab en adyuvancia y quimioterapia cuyas características histopatológicas se muestran en la **Tabla 1**. Encontramos que 16 tumores (18,6% de la cohorte HER2+), de los cuales 6 eran IMPC

puros y 10 eran mixtos con diferentes proporciones de componente micropapilar mezclado con IDC (30-40% IMPC: 4 casos, 31-70%: 2 casos, 71-90%: 4 casos). En concordancia con reportes previos, observamos que la presencia de IMPC, ya fuera puro o mixto, se asociaba con pacientes más jóvenes, con tumores más grandes y con la expresión de RE. En este punto cabe destacar que los tumores RE+ fueron considerados como receptor hormonal positivo independientemente de la expresión de RP (**Tabla 2**). Además los resultados nos devolvieron una tendencia de asociación positiva entre el estadio de los ganglios linfáticos y la presencia de IMPC (**Tabla 2**).

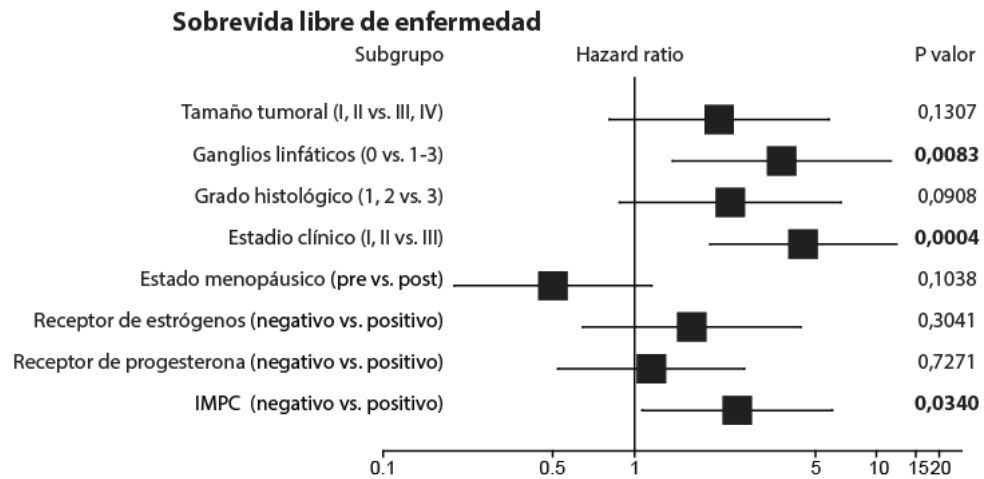
**Tabla 1 Características clinicopatológicas de la cohorte HER2+**

Características	Nº pacientes	%	Mediana	Rango
Número total de pacientes	86			
Edad (años)			50	25-79
Seguimiento (meses)			30	6-112
Estado menopáusico				
Pre	48	55.8		
Post	38	44.2		
Tamaño tumoral				
T1	33	38.8		
T2	36	42.4		
T3	12	14.1		
T4	4	4.7		
No documentado	1			
Compromiso ganglios linfáticos				
N0	44	51.2		
N1	30	34.9		
N2	5	5.8		
N3	7	8.1		
Estadío clínico				
I	25	29.1		
II	40	46.5		
III	21	24.4		
Grado histológico				
1	7	8.9		
2	28	35.4		
3	44	55.7		
No documentado	7			
Receptores estrógeno positivos	66.3			
Receptores progesterona positivos	55.8			

**Tabla 2. Asociación entre IMPC y las características clinicopatológicas**

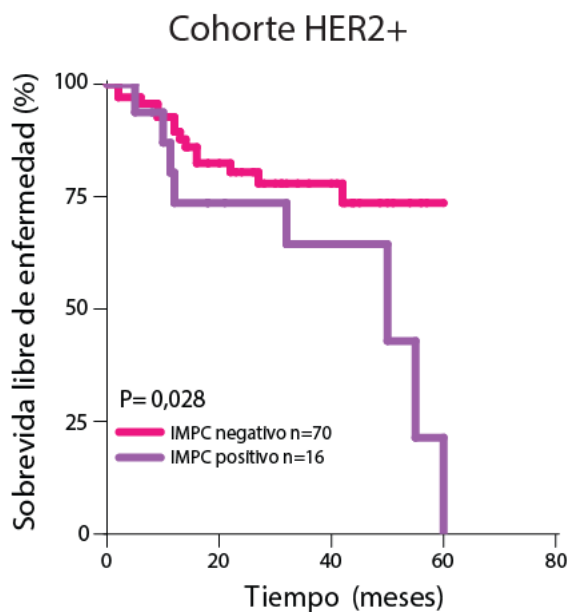
Características clinicopatológicas		no-IMPC	IMPC	P
		n (%)	n (%)	
Estadio menopáusico	pre	35 (50.0)	13 (81.3)	<b>0.021</b>
	post	35 (50.0)	3 (18.8)	
Tamaño tumoral	1	31 (44.9)	2 (12.5)	<b>0.014</b>
	2-4	38 (55.1)	14 (87.5)	
Estadio de ganglios linfáticos	0	39 (55.7)	5 (31.3)	0.068
	1-3	31 (44.3)	11 (68.7)	
Estadio clínico	I, II	52 (74.3)	13 (81.3)	0.41
	III	18 (25.7)	3 (18.7)	
Grado histológico	1,2	30 (46.2)	5 (35.7)	0.447
	3	35 (53.8)	9 (64.3)	
Receptor de estrógeno	Negativo	27 (38.6)	2 (12.5)	<b>0.04</b>
	Positivo	43 (61.4)	14 (87.5)	
Receptor de progesterona	Negativo	33 (47.1)	5 (31.3)	0.248
	Positivo	37 (52.9)	11 (68.7)	

La **Figura 2** muestra, usando el análisis univariado de COX, que el IMPC está asociado con una menor sobrevida libre de enfermedad (HR= 2,6; 95% CI 1,1-6,1; p = 0,0340), al igual que las metástasis ganglionares (HR= 3,8; 95%, CI: 1,4-10,5; P = 0,0083) y el estadio clínico (HR= 4,7; 95%CI 2,0-11,0; P= 0,00004). La curva de Kaplan-Meier reveló que la presencia de IMPC, puro o mixto, también está asociada con una menor sobrevida libre de enfermedad en los pacientes tratados con el esquema estándar de trastuzumab en adyuvancia (log Rank p = 0,028, **Figura 3**). No observamos diferencias en la sobrevida libre de enfermedad entre pacientes con IMPC puro (n = 6) y con IMPC mixto (n = 10; p = 0,594; no mostrado).



**Figura 2. La presencia de IMPC, independientemente de su proporción, otorga un mayor riesgo de recaída.** Análisis univariado de la asociación entre la supervivencia libre de enfermedad y distintos parámetros clinicopatológicos, incluida la presencia de IMPC en su forma pura o mixta. Los cuadrados representan los HR (*Hazard ratio*, riesgo relativo), las líneas horizontales indican el intervalo de confianza del 95%. Los datos fueron analizados con el modelo de regresión de Cox univariado. A la derecha se muestran la significancia estadística.

Nuestros resultados muestran que la presencia de IMPC, ya sea puro o en diferentes proporciones, define un subgrupo de pacientes con cáncer de mama HER2+ que tienen una peor respuesta a la administración estándar de trastuzumab en adyuvancia.



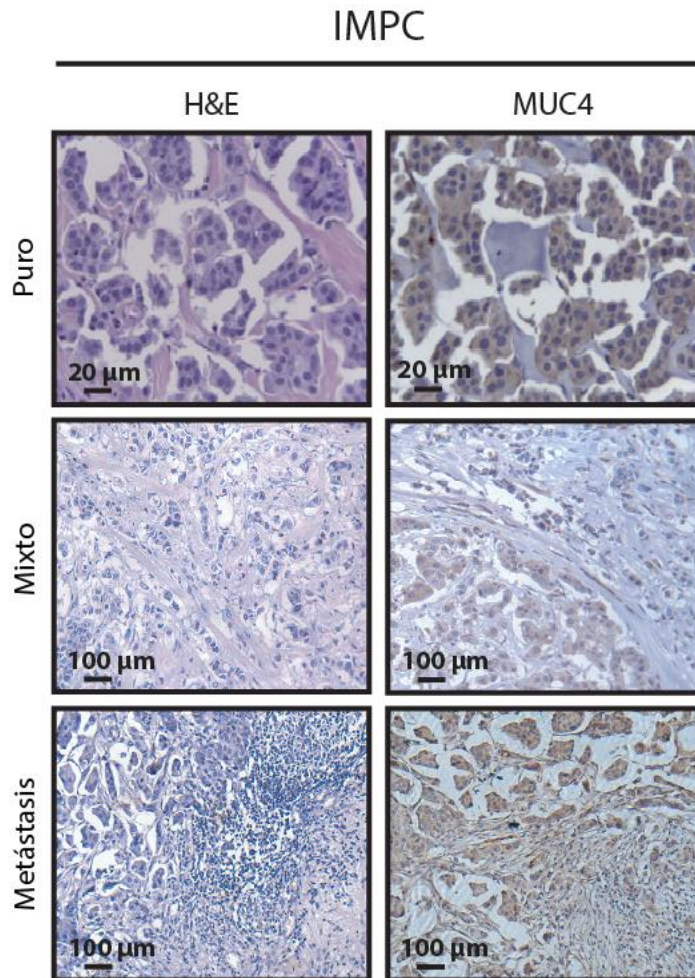
**Figura 3. La presencia de IMPC correlaciona con una menor sobrevida libre de enfermedad.** Curva de Kaplan-Meier que muestra la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad de los pacientes con tumores HER2+ tratados con trastuzumab en adyuvancia divididos según la presencia de IMPC. El P valor se calculó usando el test de log-rank.

**Table 3. Asociación entre la expresión de MUC4 e IMPC**

MUC4	no-IMPC	IMPC	P
	n (%)	n (%)	
Negativo	31 (44.3)	0 (0)	<b>0.0003</b>
Positivo	39 (55.7)	16 (100)	

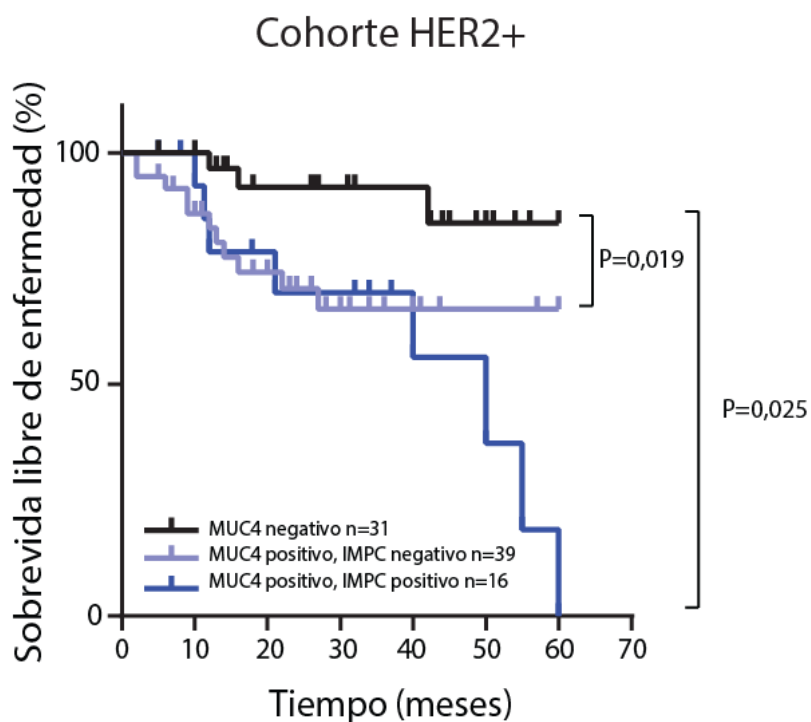
Hemos demostrado que MUC4 es un biomarcador de resistencia al trastuzumab administrado en adyuvancia [11], además el 18,6% de la cohorte HER2+ presenta diferenciación micropapilar y estos pacientes tienen una peor respuesta a la terapia. Por lo tanto, exploramos la expresión de MUC4 en IMPC. La IHQ de MUC4 en los tumores con IMPC mostró una fuerte tinción citoplásmica en todos los casos evaluados (**Tabla 3**,  $p = 0,0003$ ). Como previamente reportamos, la expresión de MUC4 es inducida por  $TNF\alpha$ . Si bien todos los IMPC fueron positivos para expresión de dicha citoquina no encontramos asociación entre su expresión y la presencia del carcinoma micropapilar (dato no mostrado). También determinamos la expresión de MUC4 en IMPC localizado en metástasis ganglionares y en los tumores primarios, independientemente del porcentaje de componente micropapilar presente en la muestra, y obtuvimos una fuerte marcación (**Figura 4**).





**Figura 4. El subtipo IMPC expresa MUC4, tanto el tumor primario como en las metástasis.** Imágenes representativas de las tinciones con H&E o IHQ de MUC4 para tumores con IMPC puro, mixto o su correspondiente metástasis.

Como observamos que los tumores MUC4+ también podían o no tener diferenciación micropapilar comparamos la sobrevida libre de enfermedad de pacientes MUC4-, MUC4+ sin IMPC y MUC4+ con IMPC. Los resultados se muestran en la **Figura 5**. Allí se observa que los pacientes con tumores MUC4- se benefician más de la terapia con trastuzumab que aquellos MUC4+ independientemente del componente micropapilar, como ya habíamos reportado previamente. Sin embargo, los pacientes MUC4+ con IMPC presentaron una menor sobrevida libre de enfermedad luego de 3 años del inicio del tratamiento que aquellos clasificados como MUC4+ sin componente micropapilar. Además, los pacientes MUC4+ con IMPC puro o mixto eran más jóvenes que los MUC4+ sin IMPC y que los MUC4- (**Tabla 4**).



**Figura 5. Los pacientes con IMPC y expresión de MUC4 tienen una menor sobrevida libre de enfermedad.** Curva de Kaplan-Meier que muestra la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad de los pacientes con tumores HER2+tratados con trastuzumab en adyuvancia divididos según la expresión de MUC4 y la presencia de IMPC. El P valor se calculó usando el test de log-rank.

**Tabla 4. Asociación de la expresión de MUC4 e IMPC con la edad al momento**

Edad (años)	Expresión de MUC4 e IMPC			P
	MUC4 negativo	MUC4 positivo/ IMPC negativo	MUC4 positivo/ IMPC positivo	
< 50	13 (42.0)	22 (56.4)	13 (81.3)	<b>0.036</b>
≥50	18 (58.0)	17 (43.6)	3 (18.7)	

## Discusión

En este trabajo describimos que el 18,6% de los cánceres de mama HER2+ poseen diferenciación micropapilar, ya sea como entidad pura o mixta, en contraste al 6% del total del cáncer de mama reportado generalmente en la bibliografía [1,2].

Además el IMPC se encuentra asociado fuertemente a tumores HER2+/receptor hormonal + (14/57, 24,6%) que al subtipo HER2+/receptor hormonal – (2/29, 6,9%). Este trabajo es el primero en explorar el componente micropapilar en una cohorte HER2+. Ha sido previamente descrito que entre el 30 y el 80% de los cánceres de mama micropapilares son HER2+ pero no existen trabajos enfocados en la respuesta a trastuzumab en tumores HER2+ con IMPC [4,14]. Demostramos que la presencia de IMPC, puro o mixto, está asociado con una menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama HER2+ tratados con trastuzumab en adyuvancia.

Comprobamos que la tinción citoplasmática de MUC4 por IHQ es fuerte en todos los casos de IMPC, ya sea en las lesiones metastásicas como en el tumor primario, incluso cuando el componente micropapilar es pequeño (10% o menos).

También se ha reportado que la presencia de TNF $\alpha$  ha sido asociada positivamente con la densidad de vasos sanguíneos en IMPC [13]. En particular, en nuestra cohorte observamos una fuerte tinción de TNF $\alpha$  en todas las muestras de IMPC.

En conjunto, estos resultados muestran que la presencia de MUC4 por sí misma es un marcador plausible para la detección de IMPC. Dado que previamente reportamos que la expresión de MUC4 está asociada con la resistencia al tratamiento estándar de trastuzumab en adyuvancia, postulamos que dicha glicoproteína en el contexto de IMPC podría ser la causa del comportamiento agresivo de este subtipo histológico.

Múltiples reportes en la bibliografía han reconocido la asociación entre la presencia del subtipo histológico micropapilar y un peor pronóstico [15,16]. En línea con estas evidencias, estos resultados muestran que el IMPC en cáncer de mama HER2+ está asociado con la expresión del RE, pacientes más jóvenes y una mala respuesta al trastuzumab en adyuvancia en conjunto con quimioterapia. Finalmente, nuestro trabajo pone énfasis en la determinación del subtipo IMPC más aun en los pacientes HER2+/receptor hormonal +, incluso si su presencia es sutil, dado que comprobamos que dichos pacientes tienen peor pronóstico y respuesta al esquema estándar de administración de trastuzumab en adyuvancia. Por último, cabe destacar que actualmente no existen terapias específicas o dirigidas para el subtipo micropapilar, pero de acuerdo a nuestros hallazgos sería prudente que los oncólogos sometan a los pacientes a monitoreos más frecuentes, tratamientos más agresivos y/o a otras terapias anti-HER2, como por ejemplo pertuzumab o lapatinib, o incluso dadas nuestras recientes publicaciones, a tratamientos con bloqueantes de TNF $\alpha$ .

## Referencias

1. Nassar H, Wallis T, Andea A, Dey J, Adsay V, Visscher D. Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma. *Mod.Pathol.* 2001;14:836-41.
2. Dieci MV, Smutna V, Scott V, Yin G, Xu R, Vielh P et al. Whole exome sequencing of rare aggressive breast cancer histologies. *Breast Cancer Res.Treat.* 2016;156:21-32.
3. Fisher ER, Palekar AS, Redmond C, Barton B, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). VI. Invasive papillary cancer. *Am.J.Clin.Pathol.* 1980;73:313-22.
4. Luna-More S, Gonzalez B, Acedo C, Rodrigo I, Luna C. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. *Pathol.Res.Pract.* 1994;190:668-74.
5. Guo X, Chen L, Lang R, Fan Y, Zhang X, Fu L. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: association of pathologic features with lymph node metastasis. *Am.J.Clin.Pathol.* 2006;126:740-6.
6. Marchio C, Irvani M, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Savage K et al. Mixed micropapillary-ductal carcinomas of the breast: a genomic and immunohistochemical analysis of morphologically distinct components. *J.Pathol.* 2009;218:301-15.
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235:177-82.
8. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annu.Rev.Med.* 2015;66:111-28.
9. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, Jr. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J.Clin.Oncol.* 2014;32:3744-52.
10. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.* 2014;15:640-7.
11. Mercogliano MF, De Martino M, Venturutti L, Rivas MA, Proietti CJ, Inurriagarro G et al. TNFalpha-Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin.Cancer Res.* 2017;23:636-48.
12. Mukhopadhyay P, Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Jain M, Pai P et al. MUC4 overexpression augments cell migration and metastasis through EGFR family proteins in triple negative breast cancer cells. *PLoS.One.* 2013;8:e54455.
13. Cui LF, Guo XJ, Wei J, Liu FF, Fan Y, Lang RG et al. Overexpression of TNF-alpha and TNFRII in invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathological correlations. *Histopathology.* 2008;53:381-8.
14. Paterakos M, Watkin WG, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum.Pathol.* 1999;30:1459-63.

15. Pettinato G, Manivel CJ, Panico L, Sparano L, Petrella G. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. *Am.J.Clin.Pathol.* 2004;121:857-66.
16. Chen L, Fan Y, Lang RG, Guo XJ, Sun YL, Cui LF et al. Breast carcinoma with micropapillary features: clinicopathologic study and long-term follow-up of 100 cases. *Int.J.Surg.Pathol.* 2008;16:155-63.

## **Abstract**

Invasive micropapillary carcinoma of the breast (IMPC) is a histological tumor variant that occurs with low frequency characterized by an inside-out formation of tumor clusters with a pseudopapillary arrangement. IMPC is an aggressive tumor with poor clinical outcome. In addition, this histological subtype usually expresses human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) which also correlates with a more aggressive tumor. In this work we studied the clinical significance of IMPC in HER2-positive breast cancer patients treated with adjuvant trastuzumab. We also analyzed mucin 4 (MUC4) expression as a novel biomarker to identify IMPC. We retrospectively studied 86 HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab and chemotherapy in the adjuvant setting. We explored the association of the IMPC component with clinicopathological parameters at diagnosis and its prognostic value. We compared MUC4 expression in IMPC with respect to other histological breast cancer subtypes by immunohistochemistry. IMPC, either as a pure entity or associated with invasive ductal carcinoma (IDC), was present in 18.6% of HER2-positive cases. It was positively correlated with estrogen receptor expression and tumor size and inversely correlated with patient's age. Disease-free survival was significantly lower in patients with IMPC (hazard ratio = 2.6; 95% confidence interval 1.1–6.1,  $P = 0.0340$ ). MUC4, a glycoprotein associated with metastasis, was strongly expressed in all IMPC cases tested. IMPC appeared as the histological breast cancer subtype with the highest MUC4 expression compared to IDC, lobular and mucinous carcinoma. In HER2-positive breast cancer, the presence of IMPC should be carefully examined. As it is often not informed, because it is relatively difficult to identify or altogether overlooked, we propose MUC4 expression as a useful biomarker to highlight IMPC presence. Patients with MUC4-positive tumors with IMPC component should be more frequently monitored and/or receive additional therapies.

# CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL NEUROPSICOLÓGICO Y MOLECULAR DE ADOLESCENTES CONSUMIDORES DE PASTA BASE DE COCAÍNA (PBC O PACO)

Silvina V. Sonzogni<sup>1</sup>; Laura Alethia de la Fuente<sup>2-3</sup>; Sofia Schurmann Vignaga<sup>2</sup>; Agustín Ibañez<sup>2</sup>; Eduardo T. Cánepa<sup>1</sup>

1-Laboratorio de Neuroepigenética y adversidades tempranas, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 2- Instituto de Neurociencia Cognitiva y Traslacional, (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Fundación INECO - Universidad Favaloro). 3-Instituto de Física de la ciudad de Buenos Aires (IFIBA), Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

## Resumen

El consumo abusivo de sustancias o adicción a drogas es una condición neuropsiquiátrica caracterizada por el deseo recurrente de continuar consumiendo la droga o sustancia a pesar de los efectos adversos<sup>1</sup>. La pasta base de cocaína (PBC) es un tipo de cocaína fumable y producto intermedio del proceso de extracción del clorhidrato de cocaína (CC). Durante el proceso de extracción se vuelve volátil a altas temperaturas permitiendo que se pueda fumar<sup>2</sup>. Se piensa que la ruta de administración es un determinante crítico en el proceso de adicción (fumable-PBC- vs inhalado-CC) porque además de la presencia de adulterantes, se cree que la PBC activa de manera más brusca el sistema de recompensa facilitando el aprendizaje contextual<sup>3-6</sup>. El consumo de PBC representa un serio problema en nuestro país dado que afecta particularmente a adolescentes de contextos socioeconómicos desfavorables por el fácil acceso y su bajo costo, sin embargo, los efectos del PBC a nivel cerebral no son bien conocidos<sup>7,8</sup>. Se cree que el consumo abusivo de sustancias produce cambios maladaptativos en los sistemas de recompensa que resultan de interacciones complejas entre los genes y el medio ambiente<sup>9,10</sup>. La regulación epigenética de la expresión génica ha emergido en los últimos tiempos como factor muy importante asociado a los comportamientos adictivos<sup>11</sup>. Sin embargo, las relaciones entre vulnerabilidad genética, cambios clínico- conductuales y modificaciones neurocognitivas generados por el consumo de PBC distan mucho de ser conocidos. El objetivo principal de este trabajo consistió en caracterizar los efectos psiquiátricos, neuropsicológicos y moleculares asociados al consumo crónico de PBC durante la adolescencia. En base a los perfiles neuropsiquiátricos y neuropsicológicos se estableció los participantes de este estudio. La población consistió en 25 participantes que cumplieron los criterios del DSM-IV para la dependencia de cocaínas fumables o PBC, 22 cumplieron los criterios para la dependencia de clorhidrato de cocaína (CC) y 25 sujetos control

(CTR). Se incluyó el grupo CC como otro modelo de adicción para contrastar con resultados de PBC. De la caracterización del perfil clínico, neuropsiquiátrico y neuropsicológico de los consumidores de PBC y CC observamos que tanto el grupo de adolescentes consumidores de PBC como CC presentaron una preferencia significativa por cada una de estas sustancias y además presentaron dependencia o abuso de otras sustancias. El grupo de consumidores presentó un inicio temprano, entre los 14 y los 16 años. No se observaron diferencias significativas en edad, educación y nivel socioeconómico al comparar los tres grupos. Al analizar las patologías psiquiátricas previas (primarias) y posteriores (secundarias) al inicio del consumo observamos una mayor frecuencia de trastornos disocial y antisocial en los grupos PBC y CC. En ambos grupos de consumidores se observó una mayor frecuencia de trastornos secundarios de la conducta.

Para evaluar el perfil neuropsicológico de los consumidores de PBC y CC se analizaron distintos tests comportamentales que miden atención, memoria, funciones ejecutivas y velocidad de procesamiento.

Observamos que el grupo PBC presenta un enlentecimiento de la velocidad de procesamiento, y una amplitud atencional disminuida. También se observó que ambos grupos (PBC y CC) presentarían una capacidad reducida para adaptar su conducta frente a los cambios ambientales y en el mantenimiento de la información para su posterior manipulación.

Con el objetivo de caracterizar el perfil molecular se midieron los niveles de cortisol en todos los grupos antes y después de un estrés leve y observamos que el eje HPA en los adolescentes consumidores de PBC y CC se encontraría desregulado. También observamos que no hay diferencias significativas entre los grupos para la longitud de los telómeros. Pero, al correlacionar ambas variables observamos una tendencia que indica que en el grupo PBC la longitud telomérica correlacionaría de manera inversa a la diferencia de cortisol antes y después de un estrés leve.

En conclusión, podríamos decir que el consumo de PBC y CC durante la adolescencia produce cambios en la conducta y cambios en la atención y la velocidad de procesamiento. Estas modificaciones también se observan a nivel molecular dado que el eje HPA parecería estar desregulado y si bien no hay cambios en la longitud telomérica si se observa una correlación inversa con la diferencia de cortisol antes y después de un estrés leve, lo que podría en un futuro provocar un acortamiento mayor de la estructura telomérica.

## **Bibliografía**

1. Goldstein RZ, Volkow ND. Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis: Neuroimaging Evidence for the Involvement of the Frontal Cortex. *Am J Psychiatry*. 2002;159(10):1642-1652. doi:10.1176/appi.ajp.159.10.1642



2. Magalhães EJ, Nascentes CC, Pereira LSA, et al. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Sci Justice*. 2013;53(4):425-432. doi:10.1016/j.scijus.2013.05.003
3. de la Fuente A, Sedeño L, Vignaga SS, et al. Multimodal neurocognitive markers of interoceptive tuning in smoked cocaine. *Neuropsychopharmacology*. March 2019;1. doi:10.1038/s41386-019-0370-3
4. Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J Addict*. 2015;24(5):475-481. doi:10.1111/ajad.12245
5. Galvalisi M, Prieto JP, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Caffeine Induces a Stimulant Effect and Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Shell Through the Pulmonary Inhalation Route of Administration in Rats. *Neurotox Res*. 2017;31(1):90-98. doi:10.1007/s12640-016-9667-8
6. elSohly MA, Brenneisen R, Jones AB. Coca paste: chemical analysis and smoking experiments. *J Forensic Sci*. 1991;36(1):93-103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007884>. Accessed March 12, 2019.
7. Pascale Antonio, Hynes Marya, Cumsille Franciasco BC. Use of cocaine base paste in South America: a review of epidemiological, medical and toxicological issues. 2014. [http://www.cicad.oas.org/oid/pubs/psc\\_EPI\\_2014\\_ENG.pdf](http://www.cicad.oas.org/oid/pubs/psc_EPI_2014_ENG.pdf). Accessed March 10, 2018.
8. / Juan Ignacio Bonfiglio, ; Juan Martín Rival ; Solange Rodríguez Espínola. *BARÓMETRO DELNARCOTRÁFICO Y LAS ADICCIONES EN LA ARGENTINA* ( Universidad Católica Argentina).; 2016.
9. Walker DM, Nestler EJ. Neuroepigenetics and addiction. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 148. ; 2018:747-765. doi:10.1016/B978-0-444-64076-5.00048-X
10. Sweitzer MM, Donny EC, Hariri AR. Imaging genetics and the neurobiological basis of individual differences in vulnerability to addiction. *Drug Alcohol Depend*. 2012;123:S59-S71. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.01.017
11. Pierce RC, Fant B, Swinford-Jackson SE, Heller EA, Berrettini WH, Wimmer ME. Environmental, genetic and epigenetic contributions to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology*. February 2018. doi:10.1038/s41386-018-0008-x



## Abstract

According to the American Psychiatric Association, substance use disorder or drug addiction is a neuropsychiatric condition characterized by a recurring desire to continue taking the drug despite harmful consequences. *Coca base paste (PBC)* is a type of smoked cocaine and is an earliest intermediate product of clorhydrate cocaine (CC) extractions. It is very toxic and highly addictive due to the presence of active adulterant and the administration route - inhaling vs smoke. Genetics, epigenetics and environmental factors may lead an individual to be more vulnerable to addiction. The main objective of this project is to characterize the psychiatric, neuropsychological and molecular effects associated with chronic consumption of PBC during adolescence. We studied 25 participants who fulfilled criteria for PBC dependence, 22 participants addicted to CC (like control of another addiction model) and 25 controls (CTR) matched by age, gender, education, and socioeconomic status. We observed that both groups (PBC and CC) showed dependence or abuse of other substances and had early onsets of drug consumption (between 14 and 16 years old). In the consumers group the most common psychiatric pathologies before the beginning of consumption were dissocial and antisocial disorders. The antisocial disorder augmented after the beginning of consumption PBC and CC groups. The PBC group showed a slowdown in processing speed and decreased attention amplitude. At molecular level, we observed that the cortisol levels before and after a mild stress was significative different within each group. Also, we observed a tendency of increased cortisol difference in PBC group vs CTR group. These results indicate that the HPA axis may be deregulated. Telomere length was no affected, but a tendency in a linear regression was observed between telomere length and the difference in cortisol levels.

# ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HRG (*HISTIDIN RICH GLYCOPROTEIN*) EN LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA Y SU ASOCIACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

Natalia Soledad Sotelo

Instituto de Biotecnología de Misiones - Universidad Nacional de Misiones

## INTRODUCCIÓN

La LLC constituye la leucemia más frecuente en occidente, representando el 30% de las leucemias del adulto

1. Se caracteriza por la acumulación de linfocitos B clonales en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides.

Los estudios citogenéticos y citomoleculares han permitido detectar rearrreglos genómicos en alrededor del 80% de los casos haciendo factible establecer grupos de riesgo <sup>2,3</sup>. Asimismo, las mutaciones en los genes de *IGHV* (*Immunoglobulin Heavy chain Variable region*) permiten dividir a la LLC en dos grupos acorde al nivel de homología respecto de la línea germinal: mutado (M) (<98%) con mejor pronóstico, y no-mutado (NM) ( $\geq 98\%$ ) asociados a peor evolución clínica <sup>4,5</sup>.

Esta entidad presenta heterogeneidad en la evolución clínica, con casos que requieren tratamiento inmediato y otros con un curso más indolente, no siendo suficientes los parámetros biológicos y clínicos disponibles para predecir este comportamiento diferencial. Si bien la comunidad médico/científica ha efectuado un gran esfuerzo para identificar marcadores moleculares adicionales capaces de predecir cuando un paciente de LLC debe o no ser tratado, al presente, ni la clasificación de Rai y/o Binet <sup>6,7</sup>, ni los distintos marcadores moleculares propuestos permiten pronosticar con certeza la evolución de la enfermedad, sobre todo para aquellos pacientes que comenzando con un curso indolente se vuelven rápidamente progresores <sup>8</sup>

Simultáneamente, las señales del microambiente son esenciales para la progresión leucémica, tanto la interacción célula-célula como los factores solubles <sup>9</sup>. Se ha demostrado que los exosomas provenientes de células tumorales transportan factores solubles que favorecen el desarrollo y establecimiento del microambiente tumoral <sup>10-12</sup>.

Estudios de nuestro grupo permitieron identificar a la proteína HRG (*Histidin Rich Glycoprotein*) diferencialmente expresada en exosomas de pacientes con LLC <sup>13,14</sup>. La misma ha sido propuesta como marcador pronóstico en diferentes tipos de cáncer: mama <sup>15,16</sup>, ovario <sup>17</sup> y páncreas <sup>18</sup>, no habiendo datos sobre su rol en LLC.

HRG es una proteína muy abundante en plasma humano, que participa en numerosas funciones con un papel controversial en cáncer <sup>19,20</sup>, siendo definida como una

proteína de fase aguda negativa <sup>21</sup>. Estructuralmente consta de múltiples dominios, permitiendo su interacción con diversos ligandos que incluyen: heparina, fosfolípidos, plasminógeno, fibrinógeno, inmunoglobulina G, C1q, el grupo hemo y Zinc <sup>22-26</sup>. Debido a la capacidad de HRG para interactuar con varios ligandos en forma simultánea, podría funcionar como una molécula adaptadora que regula numerosos procesos biológicos, habiendo sido relacionada con formación de complejos inmunes, necrosis, adhesión celular, angiogénesis, coagulación y fibrinólisis <sup>27</sup>. Esta proteína desempeña un papel múltiple y divergente en cáncer <sup>20</sup>, pudiendo actuar como pro-angiogénica (cáncer cerebral, melanoma, y cáncer de mama) <sup>28-30</sup> o anti-angiogénica (fibrosarcoma, cáncer de páncreas y gliomas) <sup>31-33</sup>, dependiendo del microambiente tumoral y de la escisión proteolítica *in-vivo* de la misma. Asimismo, existen diversos estudios que postulan su rol como marcador pronóstico en varios tipos de cáncer. En cáncer de mama, la determinación de HRG, tanto a nivel de mRNA en las células cancerosas como la proteína en plasma, fue identificada como un marcador pronóstico independiente y significativo en la supervivencia libre de recaída <sup>15,16</sup>, en tanto que en carcinoma ovárico se asociaron bajos niveles de HRG con estadios I/II comparados con donantes sanos <sup>17</sup> y en cáncer de páncreas fue identificada como un marcador pronóstico positivo <sup>18</sup>, situación que sustenta la importancia de profundizar su análisis en otras neoplasias.

Teniendo en cuenta la expresión diferencial de HRG observada por nuestro grupo mediante el análisis proteómico de exosomas de pacientes con LLC, y los antecedentes existentes en el área respecto de esta proteína, postulamos que la misma podría constituir un nuevo marcador molecular en esta patología con un rol en la patogenia de la enfermedad, y de posible significado clínico y valor pronóstico. Esto determina nuestro interés en profundizar estos estudios para una mayor comprensión de los cambios genéticos involucrados en el desarrollo de esta neoplasia, así como de la variabilidad clínica que la caracteriza, contribuyendo al diagnóstico y/o pronóstico, y aportando información sobre nuevos blancos terapéuticos. Asimismo, resulta de interés correlacionar sus niveles de expresión con otros factores pronóstico de la patología, particularmente con el estado mutacional de *IGHV*, de importancia en la evolución clínica de los pacientes.

En este contexto, el objetivo general de este trabajo fue analizar la expresión del gen de HRG en pacientes con LLC, evaluando su participación en el proceso de desarrollo y progresión de esta entidad, siendo sus objetivos específicos: 1) Cuantificar el nivel de expresión del mRNA de HRG en las células leucémicas mediante qRT-PCR; 2) Correlacionar los resultados obtenidos con el perfil mutacional de *IGHV*; 3) Establecer el significado clínico de la expresión del gen HRG en LLC; 4) Contribuir a un mejor caracterización biológica de la patología tendiente a lograr una mayor comprensión de la heterogeneidad presente en la LLC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología de Misiones (InBioMis), Posadas, Misiones. Se emplearon muestras de sangre periférica (SP) de pacientes con LLC al momento del diagnóstico y durante el seguimiento de la enfermedad, provenientes del Hospital Escuela de Agudos Dr. Ramón Madariaga, Posadas, Misiones, y eventualmente, de otras instituciones. Las mismas fueron obtenidas por el médico hematólogo con la conformidad y el consentimiento informado de los pacientes. El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Escuela de Agudos Dr. Ramón Madariaga, Posadas, Misiones y por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

Se detallan a continuación las técnicas empleadas para su desarrollo:

### 1. Lisis de glóbulos rojos de SP por RCLB (Red Cell Lysis Buffer)

El método consiste en la lisis de los glóbulos rojos mediante el reactivo de lisis RCLB (Cl<sub>2</sub>Mg 1M; ClNa 5M; Tis- HCl 1M pH 7,6) que permite separar el pellet de glóbulos blancos de una muestra de SP anticoagulada con EDTA.

- a) Las muestras de SP se centrifugan durante 10 min a 2500 rpm.
- b) El plasma se separa y conserva a -70°C.
- c) Los pellets de células se incubaron con RCLB 10-15 min, agitando cada 2-3 min por inversión.
- d) Las muestras se centrifugaron 5 min a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y se realizaron 3-4 lavados con RCLB, hasta obtener un pellet de células blancas.
- e) Las células se contaron en cámara de Neubauer, y se resuspendieron en trizol (0,8-1 ml por 500.000 cels aprox.) donde se conservan a -70°C hasta su uso.

### 2. Extracción de RNA y obtención de los respectivos cDNA

Se realizó mediante el método de trizol-cloroformo, seguido de una purificación con isopropanol. La síntesis de los cDNA total se efectuó por RT-PCR usando *random-primers*.

### 4. Determinación del perfil mutacional de los genes *IGHV* y de *HRG*

Empleando las condiciones previamente publicadas (*Clin Lymph Myel Leuk* 2013; 13: 447–457), a partir de cDNA obtenido se realizaron 6 reacciones de PCR por muestra con 6 primers forward (VH1-6) y un único primer reverse (JH) (ver tabla 1), luego realiza la electroforesis en gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio y visualización bajo luz UV, seguido de purificación empleando GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), y posterior secuenciación automática.

<b>Tabla 1: Listado de <i>primers</i> y secuencias</b>	
<b>Primer</b>	<b>Sequence (5' to 3')</b>
VH1	CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG
VH2	TCCTGCGCTGGTCAAAGCCACACA
VH3	GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
VH4	TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC
VH5	GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA
VH6	CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG
JH Biom	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC
GAPDH Fw	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA
GAPDH Rv	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTT
*HRG Fw	GATCATCATCATCCCCACAAG
*HRG Rv	GGGCACAAGGTCCATAGTC
ACTINA Fw	AGCGGGAAATCGTGCGTG
ACTINA Rv	CAGGGTACATGGTGCC

*\*Primers descritos por Eissa et al 2014*

El análisis de las secuencias VH se efectúa mediante las bases de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), identificando los segmentos clonales y el porcentaje de homología con la línea germinal.

## **RESULTADOS**

Se utilizaron muestras de sangre periférica de 7 pacientes con LLC. Tabla 2. Los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes fueron los siguientes:

### Criterios de inclusión

- Pacientes con LLC al momento del diagnóstico o durante el seguimiento de la enfermedad.
- Aceptación de participar y firma del consentimiento informado.

### Criterios de exclusión

- Negativa a participar o al proceso de consentimiento informado.

Tabla 2: Características clínicas	
N° de pacientes (n)	7
Sexo F/M	4/3
Edad media (años) (rango)	73,75 (64 – 85)
Estadios clínicos (%)	
– Rai 0	14,3
– Rai I–II	57,1
– Rai III–IV	28,6

F: Femenino; M: Masculino; n: número

El gen más frecuentemente encontrado como resultado de la determinación de la determinación del perfil mutacional de los genes *IGHV*, fue *IGHV3* en 4 pacientes: 2 no mutados y 2 mutados (2 NM y 2 M) respecto a la línea germinal. El siguiente gen en orden de abundancia fue *IGHV4*, hallado en 2 pacientes (uno NM y uno M), finalmente *IGHV1* en un paciente NM. Figura 1. Tabla 3.

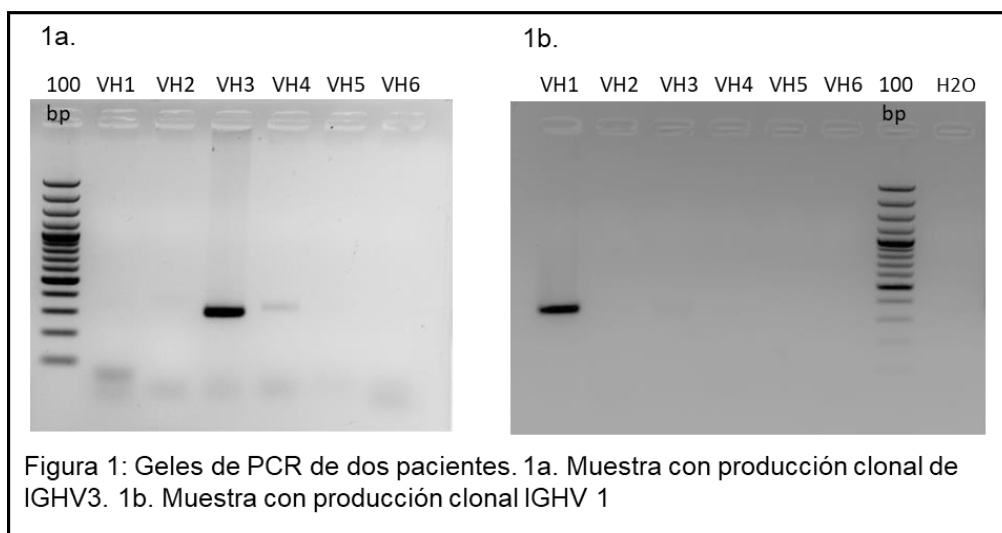


Figura 1: Geles de PCR de dos pacientes. 1a. Muestra con producción clonal de *IGHV3*. 1b. Muestra con producción clonal *IGHV1*



<b>Tabla 3: Relación de Familia IGHV y genes encontrados en los pacientes</b>		
<b>Familia IGHV</b>	<b>Genes*</b>	<b>Estado mutacional**</b>
VH3	IGHV3-30*09	M
	IGHV3-15*01	M
	IGHV3-48*01	NM
	IGHV3-21*01	NM
VH4	IGHV4-39*01	NM
	IGHV4-34*07	M
VH1	IGHV1-69*01	NM

\* Según las bases de datos IMGT e IgBlast

\*\* M: Mutado; NM: No Mutado

Una proporción de pacientes con LLC exhibe secuencias de aminoácidos (aa) altamente homólogas en la región VH CDR3 (*variable heavy chain complementarity-determining region 3*) de la IGH<sup>34,35</sup>, crítica para la elaboración del sitio de reconocimiento antigénico. Esas secuencias casi idénticas denominadas “estereotipadas” (BCRE; *B-cell receptor estereotipado*), podrían determinar especificidades antigénicas similares<sup>34,35</sup>. Las mismas se encuentran con mayor frecuencia en los casos con IGHV-NM y se hallan relacionados con el curso clínico de la enfermedad<sup>36,37</sup>.

Mediante la herramienta bioinformática ARResT/AssignSubsets (<http://tools.bat.infspire.org/arrest/assignsubsets/>). Analizamos la presencia de estereotipos entre los pacientes NM siguiendo el nuevo enfoque preconizado por Agathangelidis y col<sup>38</sup>. hallamos que dos de los pacientes del grupo de los NM presentaron sus secuencias de aminoácidos VH CDR3 estereotipadas (CLL#3: *agresive*; CLL#2: *warming*), lo que constituye un marcador de mal pronóstico adicional para estos pacientes.

Ninguna de las muestras de este estudio resultó positiva la determinación de HRG por PCR.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

En el presente estudio se efectuó el análisis del uso del gen IGHV, el estado mutacional y la presencia de BCREs en pacientes con LLC de Posadas (Misiones, Argentina).

El análisis de la serie de pacientes exhibió una distribución similar de casos con genes IGHV M y NM que aquéllos reportados para poblaciones occidentales<sup>39-41</sup>.

En cuanto a la distribución familiar de IGHV, la serie muestra una mayor representación de la familia IGHV3 seguida de IGHV4 y en menor medida IGHV1, dicha distribución es característica de los pacientes de Argentina<sup>36,37</sup>.

La presencia de BCREs se correlacionó con la peor evolución clínica de los pacientes, en los dos casos.

A pesar de que no fue posible determinar la presencia del mensajero de HRG en las muestras analizadas, dado los antecedentes bibliográficos no podemos descartar su posible papel como marcador pronóstico en LLC. La negatividad de las muestras en estas determinaciones depende de muchos factores, como la pureza del RNA, la calidad del cDNA obtenido, la conservación de las muestras, etc. Además de los problemas técnicos, las muestras analizadas fueron escasas, por lo que se requeriría un mayor número de muestras para analizar su valor como marcador pronóstico.

El presente estudio es una primera aproximación del estudio de LLC en Posadas (Misiones), dado que no había antecedentes autóctonos, las determinaciones se envían en general a Buenos Aires. Es decir que desde el punto de vista asistencial, se realizó a nivel local determinación del estado mutacional de los genes *IGHV*, con la descripción de los genes y los re-arreglos involucrados, beneficiando la estratificación de los pacientes para una mejora en el seguimiento y la toma de decisiones terapéuticas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**: 804–15.
2. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–6.
3. Travella A, Ripollés L, Aventin A, Rodríguez A, Bezares RF, Caballín MR *et al.* Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol* 2013; **31**: 79–87.
4. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner a, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1848–1854.
5. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840–7.
6. Rai KR, Montserrat E. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; **24**: 252–6.
7. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48**: 198–206.
8. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet (London, England)* 2008; **371**: 1017–29.
9. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014; **24**: 71–81.
10. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 619–24.
11. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic

- EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 3794–9.
12. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; **123**: 1603–11.
  13. Sotelo N, Prieto D, Morande P, Abreu C, Ortega C, Correa A *et al.* Leukemia Lymphoma. In: *Proteomic characterization of CLL exosomes during disease evolution*. 2015, p 151.
  14. Prieto D\*, Sotelo N\*, Seija N\*, Sernbo S, Durán R, Gil M *et al.* S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF-kB activity during disease progression. *Blood* 2017 130:777-788; \*Equal contribution.
  15. Eissa S, Azzazy HME, Matboli M, Shawky SM, Said H, Anous FA. The prognostic value of histidine-rich glycoprotein RNA in breast tissue using unmodified gold nanoparticles assay. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; **174**: 751–61.
  16. Matboli M, Eissa S, Said H. Evaluation of histidine-rich glycoprotein tissue RNA and serum protein as novel markers for breast cancer. *Med Oncol* 2014; **31**: 897.
  17. Wu J, Xie X, Liu Y, He J, Benitez R, Buckanovich RJ *et al.* Identification and confirmation of differentially expressed fucosylated glycoproteins in the serum of ovarian cancer patients using a lectin array and LC-MS/MS. *J Proteome Res* 2012; **11**: 4541–52.
  18. Roberts AS, Campa MJ, Gottlin EB, Jiang C, Owzar K, Kindler HL *et al.* Identification of potential prognostic biomarkers in patients with untreated, advanced pancreatic cancer from a phase 3 trial (Cancer and Leukemia Group B 80303). *Cancer* 2012; **118**: 571–578.
  19. Poon IKH, Patel KK, Davis DS, Parish CR, Hulett MD. Histidine-rich glycoprotein: The Swiss Army knife of mammalian plasma. *Blood* 2011; **117**: 2093–2101.
  20. Johnson LDS, Goubran H a, Kotb RR. Histidine Rich Glycoprotein and Cancer: A Multifaceted Relationship. *Anticancer Res* 2014; **604**: 593–603.
  21. Saigo K, Shatsky M, Levitts LJ, Leungq LLK. Interaction of Histidine-rich Glycoprotein with Human T Lymphocytes \*. 1989.
  22. Koide T, Foster D, Yoshitake S, Davie EW. Amino acid sequence of human histidine-rich glycoprotein derived from the nucleotide sequence of its cDNA. *Biochemistry* 1986; **25**: 2220–5.
  23. Walz DA, Bacon-Baguley T, Kendra-Franczak S, DePoli P. Binding of thrombospondin to immobilized ligands: specific interaction with fibrinogen, plasminogen, histidine-rich glycoprotein, and fibronectin. *Semin Thromb Hemost* 1987; **13**: 317–25.
  24. Vu TT, Stafford AR, Leslie BA, Kim PY, Fredenburgh JC, Weitz JI. Histidine-rich glycoprotein binds fibrin(ogen) with high affinity and competes with thrombin for binding to the gamma'-chain. *J Biol Chem* 2011; **286**: 30314–23.
  25. Poon IKH, Parish CR, Hulett MD. Histidine-rich glycoprotein functions cooperatively with cell surface heparan sulfate on phagocytes to promote necrotic cell uptake. *J Leukoc Biol* 2010; **88**: 559–569.
  26. Jones AL, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein binds to cell-surface heparan sulfate via its N-terminal domain following Zn<sup>2+</sup> chelation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 30114–22.
  27. Jones AL, Poon IKH, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein specifically binds to necrotic cells via its amino-terminal domain and facilitates necrotic cell phagocytosis. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35733–41
  28. Hale JS, Li M, Sinyuk M, Jahnen-Dechent W, Lathia JD, Silverstein RL. Context dependent role of the CD36-- thrombospondin--histidine-rich glycoprotein axis in tumor angiogenesis and growth. *PLoS One* 2012; **7**: e40033.
  29. Klenotic P a, Huang P, Palomo J, Kaur B, Van Meir EG, Vogelbaum M a *et al.* Histidine-

- rich glycoprotein modulates the anti-angiogenic effects of vasculostatin. *Am J Pathol* 2010; **176**: 2039–2050.
30. Simantov R, Febbraio M, Crombie R, Asch AS, Nachman RL, Silverstein RL. Histidine-rich glycoprotein inhibits the antiangiogenic effect of thrombospondin-1. *J Clin Invest* 2001; **107**: 45–52.
  31. Olsson A-K, Larsson H, Dixelius J, Johansson I, Lee C, Oellig C *et al.* A fragment of histidine-rich glycoprotein is a potent inhibitor of tumor vascularization. *Cancer Res* 2004; **64**: 599–605.
  32. Tugues S, Honjo S, König C, Noguier O, Hedlund M, Botling J *et al.* Genetic deficiency in plasma protein HRG enhances tumor growth and metastasis by exacerbating immune escape and vessel abnormalization. *Cancer Res* 2012; **72**: 1953– 63.
  33. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C *et al.* HRG Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Inducing Macrophage Polarization and Vessel Normalization through Downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 2011; **19**: 31–44.
  34. Bomben R, Dal Bo M, Capello D *et al.* Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptor: results from Italian multicentre study. *Br J. Haematol.* 2009; **144**: 492-506.
  35. Messmer BT, Albesiano E, Messmer D *et al.* The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood.* 2004; **103**: 3490-5.
  36. C Stanganelli, N Sotelo, ME Márquez, J Cabrera, PA Deglesne *et al.* Receptores estereotipados en pacientes con leucemia linfocítica crónica. Frecuencia y distribución en diferentes países de Latinoamérica. *Revista Hematología* 2018; **22** (1), 13-20
  37. C Stanganelli, D Coe Torres, C Ortega, N Sotelo, ME Márquez, *et al* on behalf of the Latin American Group of Chronic Lymphocytic Leukemia (LAG-CLL). Distinctive IGHV gene usage and stereotyped receptors in South American patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematological Oncology In Press* July 2019
  38. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A y col. Stereotyped B-cell receptors in one third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapeutic interventions. *Blood.* 2012; **119**:4467-75.
  39. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C y col. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood.* 2005; **105**: 1678-85.
  40. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M y col. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica.* 2010; **95**: 2072-9.
  41. Maura F, Cutrona G, Fabris S y col. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE.* 2011; **6**:e24313

# PREVALENCIA DE RIESGO DE ASMA EN ADOLESCENTES EXPUESTOS A CENIZA VOLCÁNICA, EN 2 POBLACIONES DE LA PATAGONIA

Ignacio Zabert, Sergio Benitez, Fabian Mariluan, Gustavo E Zabert

Universidad Nacional del Comahue

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la prevalencia de riesgo de asma en adolescentes expuestos a ceniza volcánica a un año de la erupción del Volcán Calbuco, en 2 ciudades con diferentes grado de afectación.

**Métodología:** Estudio de Corte Transversal, en adolescentes de 13-14 años en dos ciudades con diferente grado de exposición a ceniza volcánica: San Carlos de Bariloche y Cipolletti. Se aplicó cuestionario y video-cuestionario ISAAC para determinar riesgo de asma. Las variables demográficas y percepción de exposición, se obtuvieron por cuestionario previo a la aplicación de metodología ISAAC.

**Resultados:** Se encuestaron 511 sujetos en total. Se reportó prevalencia de síntomas de riesgo de asma en Bariloche resultó de 14% comparado con Cipolletti que reportó 10% ( $p=0.32$ ). Se informó mayor exposición a ceniza volcánica en la ciudad de Bariloche vs. Cipolletti; 14% y 6% respectivamente con  $p<0.05$ .

**Conclusiones:** La falta diferencia estadísticamente significativa respecto a la prevalencia de síntomas de riesgo de asma entre ambas poblaciones con diferente nivel de exposición y tras 18 meses de la erupción volcánica mas exposición respiratoria a ceniza volcánica, pareciera no presentar impacto clínico en la salud respiratoria.

## Palabras clave:

Prevalencia de Asma, Ceniza Volcánica, Erupción Volcánica

## INTRODUCCION

Actualmente en el mundo se encuentran más de 500 volcanes en actividad, aproximadamente 40 a 50 erupciones anuales que afectan al 9% de la población mundial. (1)

La actividad volcánica debe ser definida como efusiva o explosivas; erupción explosiva se clasifican en 2 categorías: magmáticas (fragmentación se debe a expansión de gases magmáticos) y freatomagmáticas (fragmentación causada por la interacción entre magma-agua); la primera de ellas es la más frecuente. La emisión de material volcánico puede ser en forma lava, ceniza o gases, cada una ellas presentan características e impacto diferentes. La composición del material emitido depende de la mineralización del magma como así también la interacción durante el pasaje de este por el conducto volcánico; encontrando así diferencias de composición química entre los diferentes eventos eruptivos.(2,3)

Tras una erupción volcánica, el material piroclástico emitido provoca impacto socioeconómico en las localidades que rodean al volcán; afectando al ganado, la cosecha, el turismo además de cambios en la actividad diaria de los habitantes. También, puede causar un importante efecto en la salud por exposición a ceniza volcánica, que dependerá de los niveles de exposición, de la concentración, tamaño de la partícula y su composición para

generar diferentes afecciones en el organismo.(4) Los sistemas corporales de mayor compromiso son el ocular y respiratorio, la irritación causada por estas partículas es característica durante la exposición aguda.(2,5)

El Asma bronquial es una enfermedad respiratoria crónica, caracterizada por inflamación crónica de la vía aérea; ésta se define con historia síntomas de disnea, sibilancias, tos y opresión torácica que varía en el tiempo e intensidad. La prevalencia mundial se estima entre 1-21% y en Argentina se halla alrededor entre 10-20% en adultos.(6,7) Esta es una entidad heterogénea en la que se identifican, grupos con diferencias clínicas, fisiopatológicas y demográficas llamados “fenotipos”; sin embargo, esta enfermedad puede deteriorar sus síntomas ante la exposición de agentes inhalantes. (8,9)

Desde la década del 80 y a partir de la erupción del volcán Santa Helena en Estados Unidos, se han estudiado estos infrecuentes eventos que causan impacto en la salud de la población expuesta.(6) Estudios previos reportaron sobre el efecto de la ceniza en el sistema respiratorio, la mayoría documentó incremento en síntomas respiratorios (sibilancias, tos, expectoración) y aumento en exacerbaciones agudas de enfermedades respiratorias crónicas.(3,10,11) De modo semejante, estudios realizados tras la erupción del volcán Eyjafjallajökull (2010) en Islandia, hallaron incremento de síntomas respiratorios y deterioro de enfermedades crónica como Asma, pero no encontraron deterioro de la función pulmonar.(12,13) Buist et al, reportaron un incremento en síntomas respiratorios tras exposición aguda. Los mismos autores, tampoco hallaron un efecto con deterioro de la función pulmonar en niños de 8-13 años.(14) Forbes et al reportó un incremento del 6% en síntomas de asma en niños de 13-14 años con exposición alta/moderada a ceniza volcánica.(10)

La exposición crónica a ceniza volcánica y su efecto en la salud pulmonar ha presentado dificultades para lograr conclusiones, Buist et al tras 4 años de seguimiento no hubo cambios en la función pulmonar trabajadores de la madera. Se requieren mayor cantidad de estudios para evaluar efecto a la exposición crónica; sin embargo, requieren un seguimiento muy prolongado en el tiempo para lograr observar algún efecto.

Durante la erupción del volcán Puyehue, poca información local se ha reportado sobre el efecto en la salud de los individuos expuestos a ceniza. Estudios reportaron que no hay deterioro en la función pulmonar previo y posteriormente a la erupción del volcán, en adultos asmáticos y con EPOC.(15) Hasta el momento, no se han reportado ningún estudio sobre el efecto en la salud de la población del material piroclástico emitido por el Volcán Calbuco. Poca información el efecto de la ceniza en el sistema respiratorio en población adolescente expuesto y comparar entre dos regiones con diferente grado de exposición. La importancia de este estudio es generar mayor información y conocimiento sobre estos eventos, para evaluar cuál fue el efecto de la ceniza en la salud respiratoria en la población pediátrica.

## **Hipótesis**

La hipótesis de este protocolo es que la prevalencia del riesgo de asma incrementa en adolescentes con alta exposición a ceniza volcánica comparado a la misma población con baja exposición.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

Determinar cambios en la prevalencia de sujetos en riesgo de asma en la población de estudiantes de nivel medio expuestos a cenizas volcánicas comparado contra no expuestos.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar cada componente del cuestionario ISAAC: severidad de síntomas de asma y síntomas inducidos por ejercicio;
- Evaluar la percepción de exposición a ceniza volcánica.
- Evaluar la asociación entre la exposición a ceniza volcánica y la prevalencia de riesgo de asma;

## **METODOLOGIA**

Se desarrolló durante los meses de Octubre y Noviembre del año 2016 estudio de corte transversal en la población adolescente de 2 ciudades con diferente grado de exposición a ceniza volcánica de la provincia de Rio Negro. Se aplicó cuestionario auto-llenado y video-cuestionario ISAAC (International Study of Asthma and Allergy Childhood), con el objetivo de evaluar la prevalencia de asma. La metodología propuesta por ISAAC se encuentra estandarizada y con validación a la lengua hispana, en el ámbito nacional se desarrolló en tres ciudades de la Argentina (Córdoba, Neuquén y Salta) en 2003.<sup>(16)</sup> A este cuestionario, se adiciona una encuesta que evaluará datos demográficos, percepción de exposición a ceniza volcánica y diagnóstico reciente asma; ya utilizado en estudio previo luego de la erupción del cordón Caulle-Puyehue.<sup>2</sup>

### **Variables:**

1. Diagnóstico del riesgo de asma (Variable Primaria): La respuesta afirmativa de la pregunta 2 (¿En los últimos 12 meses tuviste silbidos o ruidos en el pecho?) otorgaran el diagnóstico de síntomas de asma.
2. Variables Secundarias:
  - Severidad de síntomas de asma: se tomó misma definición utilizada por ISAAC, todos aquellos que respondieron sibilancias en 12 meses se considera síntomas severos: más de 4 eventos de sibilancias en el último año, o más de 1 evento de despertar nocturno por semana, o sibilancias afectan el habla.
  - Percepción de Exposición a ceniza volcánica: Pregunta que no se encuentra dentro del cuestionario ISAAC, va a ser anexada a las preguntas demográficas. Explora el reconocimiento de la exposición a ceniza volcánica.

### **Descripción del ámbito de estudio:**

El estudio se llevó a cabo en las escuelas nivel medio de dos ciudades con diferente grado de exposición a ceniza volcánica. Las ciudades seleccionadas para el estudio se identificaron como alto o bajo nivel de exposición de la población a ceniza volcánica: a) San Carlos de Bariloche (SCB) alto nivel, b) Cipolletti (CIP) bajo nivel (*Imagen 1*). El cuestionario se aplicó en la población de sujetos entre 13 y 14 años cursando primer año de colegios de nivel medio, en ámbitos de gestión tanto Público como Privado; siguiendo los lineamientos metodológicos del estudio ISAAC. Además, el trabajo de campo se desarrolló en ambas localidades en durante el mismo periodo anual, logrando disminuir la variabilidad estacional.

Los *criterios de inclusión*: Niño de 13/14 años de edad que concurra a escuela de nivel medio, que se encontraban viviendo en la ciudad correspondiente entre el momento de la erupción y la encuesta. Los *criterios de exclusión*: a) sujetos que se mudaron a la ciudad o de la ciudad entre la erupción y el momento de la medición; b) se encuentran excluidas las escuelas de enseñanza especial, debida a que los cuestionarios deben ser auto llenado por los niños; c) la no autorización por los padres/tutores del Consentimiento Informado u la falta de firma de los mismos. El reclutamiento y Selección de Individuos: La estrategia de reclutamiento se realizó acorde a la estrategia planteada por ISAAC. Se realizó randomización grupal

estratificada de los colegios, ajustado a la relación existente de gestión (Privados vs. Público); de los colegios seleccionados, se eligieron los dos cursos con mayor cantidad asistentes.

**Selección y tamaño de la muestra:** El tamaño muestral se basó en el objetivo primario, prevalencia de asma previas tomadas con el mismo instrumento (ISAAC). En la población con alta exposición a ceniza volcánica se observó 14% de prevalencia de síntomas de asma, comparado con población baja exposición 10%. El cálculo se realizará con la prueba-Fleiss (two-sample, two-tales) para 2 muestras y 2 colas, con nivel de significancia ( $\alpha$ ) 0,05 y poder (1- $\beta$ ) de 80%. Esperando un cambio de prevalencia en la población del 16%, el resultado de 498 niños para cada población de estudio. Se calcula que habrá un 10% de pérdida de información, por lo tanto, se tomó un tamaño muestral de 540 niños.

#### **Plan de análisis de los resultados:**

Las variables se expresaron en porcentajes para aquellas variables categóricas, media (DS) o mediana (IC) en aquellas variables continuas acorde a distribución. La comparación entre los niveles de prevalencia de asma actuales y los previos se utilizó  $\chi^2$  para una muestra. Para los objetivos específicos, las diferencias entre asmáticos y no asmáticos se evaluarán con el  $\chi^2$  y T-test, dependiendo de la distribución de las variables. El análisis se realizará con el paquete comercial de STATA 14(StataCorp LLC, Texas, USA)

## **RESULTADOS**

Se encuestaron 511 sujetos en total, con una distribución 341 y 170 encuestas entre Cipolletti y San Carlos de Bariloche, respectivamente. En la Tabla 1 se describen las frecuencias demográficas de la población encuestada ajustada por ciudad. El sector público fue mayoritariamente encuestado en ambas ciudades; el género femenino tuvo mayor frecuencia en la ciudad de Cipolletti respecto a Bariloche, sin diferencias significativas. La prevalencia de tabaquismo pasivo en la ciudad de Bariloche de 23.8%, superior a lo observado en Cipolletti que fue de 14.7%,  $p=0.01$ . El reporte de percepción a exposición a ceniza volcánica resultó mayor en la ciudad de Bariloche vs. Cipolletti; 14,3% vs 6,7%, respectivamente ( $p=0.006$ ).

La prevalencia de sibilancias en últimos 12 meses, fue de 14,7% para la ciudad de Bariloche comparado con 10,2% para la población de Cipolletti, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.36$ ). Los síntomas de severidad de asma bronquial fueron mayores en la población de Bariloche respecto a la Cipolletti; 7,7% vs. 4,1%, respectivamente ( $p=0.22$ ). El resto de los resultados en relación al cuestionario ISSAC se muestran en la Tabla 2.

Los síntomas de asma por video cuestionario mostraron elevada prevalencia en las variables sibilancias en reposo, despertar por tos y crisis severa alguna vez en la vida; sin embargo, estos valores son menores al referirlos durante los últimos 12 meses. No se observó diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones estudiadas (Tabla 3).

Se realizó análisis de regresión logística univariada, logrando observar asociación en sibilancias en últimos 12 meses en aquellos sujetos que reportaron haber presentado diagnóstico de asma en los últimos 12 meses (OR 3.93 IC95 1.03-15.08,  $p=0.05$ ); cuando se ajustaba por nivel de exposición (ciudad) esta asociación se torno mas fuerte, OR 4.35 IC95 1.12-16.94 ( $p=0.03$ ). El resto de las variables no se observó asociaciones con la variable primaria; también se realizó regresión logística con una variable secundaria como sibilancias severas que se observa en la Tabla 4.



## DISCUSIÓN

Desarrollamos el primer estudio en evaluar sintomatología respiratoria posterior a la erupción del volcán Calbuco, en población pediátrica y en dos ciudades con diferente grado de exposición a ceniza volcánica (Figura 1). A 18 meses de la erupción, el total de la muestra reportó baja percepción de contacto a material volcánico, siendo mayor el reporte en aquellos sujetos que habitan más cerca del volcán.

La prevalencia de sibilancias en los últimos 12 meses en el total de la población estudiada es similar a lo reportado previamente en Argentina por *Mallol et al* en el estudio ISAAC fase III, desarrollado previo a las erupciones volcánicas. Aun así, al evaluar y comparar nuestros resultados por ciudad con la localidad geográficamente mas cercana (Neuquén) del estudio ISAAC fase III; la prevalencia hallada en Bariloche se encuentra superior y es similar los resultados hallados en Cipolletti en contraste a lo reportado por *Mallol et al.*<sup>20</sup> A su vez, la prevalencia de sibilancias en últimos 12 meses reportada en Bariloche fue mayor a los datos publicados por *Salmun* en un estudio realizado previo a las erupciones de Puyehue y Calbuco (2011 y 2015, respectivamente); aun así, estos hallazgos son similares al compararlos con la prevalencia de sibilancias en el último año de la ciudad de Bariloche en estudio posterior a la erupción del Volcán Puyehue.<sup>17,21</sup> Al contrastar con evidencia internacional con misma metodología, similar población y luego de la erupción Soufriere Hills en la isla Monserrat; la prevalencia de sibilancias en últimos 12 meses es levemente inferior a lo reportado por *Forbes et al* (16.4%).<sup>11</sup>

La diferencia hallada entre las ciudades estudiadas no obtuvo diferencias estadísticamente significativas, esto podría deberse a factor ambiental y temporal. Durante la exposición aguda a ceniza volcánica, los síntomas respiratorios incrementan comparado a lo de la población general, estos resultados se pueden apreciar en la encuesta de prevalencia de síntomas respiratorios durante la exposición aguda y contrastarlo con la encuesta nacional de prevalencia de asma en adultos de Argentina.<sup>8,22</sup> El factor temporal tiene implicancia debido a que al tiempo la ceniza decanta y puede re-suspenderse bajo la influencia del medio ambiente; generando heterogeneidad en la exposición y posible variabilidad de síntomas en la población.<sup>23</sup>

Dentro de las limitaciones del trabajo, fue no haber logrado el tamaño muestral calculado entendiendo que podemos haber caído bajo error tipo II ( $\beta$ ); al observar escaso interés de algunas instituciones escolares (directivos y supervisores escolares) respecto a esta investigación y previendo escaso reclutamiento, nuestra respuesta fue aplicar el plan de contingencia con el objetivo de lograr la  $n$  calculada en las instituciones con interés de participar. La concentración de material volcánico particulado en el ambiente resultó difícil de cuantificar, ya que si bien existe tecnología en la zona para realizar las mediciones no se hallaba disponible en el momento del trabajo de campo debido a problemas técnicos. La medición de la función pulmonar no se contempló en este trabajo acorde a la experiencia de este grupo en estudio previo en la ciudad de Bariloche y en este grupo etario hallamos un bajo nivel (5,2%) de alteración funcional en población altamente expuesta.<sup>17</sup>

Creemos que este estudio nos puede brindar una respuesta a un evento eruptivo que tiene impacto regional pudiendo replicarse en otras partes del mundo.<sup>24</sup> Consideramos que el incremento de los síntomas de asma en la población más cercana al evento eruptivo podría deberse a la exposición del material emitido. Entendemos que es la primera evidencia reportada tras la erupción del Volcán Calbuco, encontrando pequeñas diferencias no significativas entre ciudades con distinto grado de exposición a ceniza volcánica. Estos resultados nos permiten conocer la prevalencia de síntomas de asma vinculados con la exposición a ceniza volcánica y podría vincularse con incremento de sintomatología en aquellas personas con mayor exposición. Este estudio aporta nueva evidencia con el objetivo

de conocer el impacto de la ceniza volcánica en la salud respiratoria, como así producir mayor cantidad y calidad de estudios tras eventos eruptivos.

## CONCLUSIONES

Creemos que este estudio nos puede brindar una respuesta a un evento regional que se puede replicar en otras partes del mundo. Consideramos que el incremento de los síntomas de riesgo de asma en la población más cercana al evento eruptivo puede deberse a la exposición del material emitido. Aun así consideramos que más estudios deben ser realizados para mejorar la evidencia respecto a la salud respiratoria y la exposición a material volcánico.

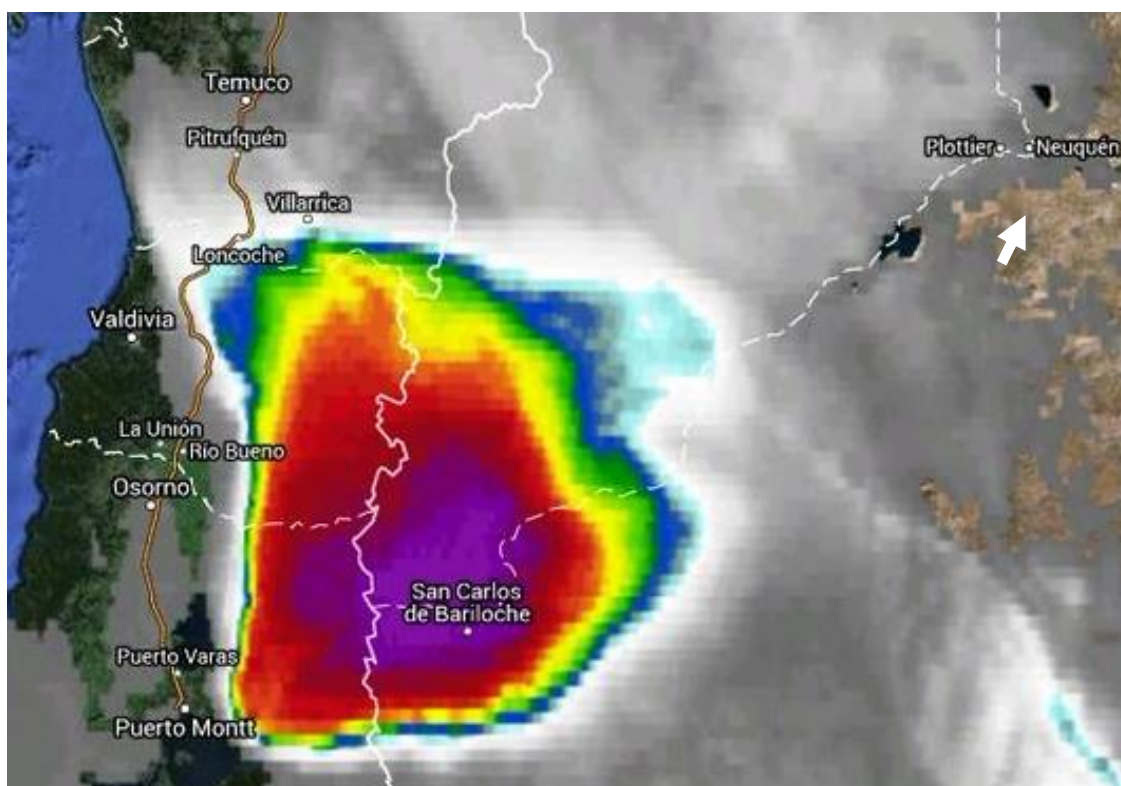


Imagen 1. Imagen satelital de la erupción del Volcán Calbuco; se observan las dos localidades estudiadas, San Carlos de Bariloche (flecha negra) y Cipolletti (flecha blanca).

Tabla 1. Resultados demográficos de ambas poblaciones encuestadas.

	Total (n: 511)		Cipolletti (n:341)		Bariloche (n:170)		p
	n	%	n	%	n	%	
Edad <i>media</i> (DS)			14.1	0.64	14.0	0.56	
Sector ( <i>Público</i> )	340	66.5	210	61.6	130	76.5	0.001
Genero ( <i>Femenino</i> )	283	56.1	196	58.7	87	51.2	0.11
Tabaquismo							
Pasivo	90	17.7	50	14.7	40	23.8	0.01
Experimentador	125	24.7	78	22.9	47	28.3	0.19
Activo	17	3.3	10	2.9	7	4.1	0.35
Diario	11	2.1	7	2.1	4	2.4	0.66
Contacto a Ceniza	47	9.2	23	6.7	24	14.3	0.006
Dx Asma 12 meses	24	4.7	16	4.7	8	4.8	0.95

$\chi^2$  Pearson para las variables.

Tabla 2. Cuestionario ISAAC. Se describe variable primaria de síntomas de asma y variables secundarias, ajustado por ciudad.

	Total n: 511		Cipolletti n:341		Bariloche n:170		p
	n	%	n	%	n	%	
Sibilancias toda la vida	126	24.6%	81	23.8	45	27.1	0.41
Sibilancias últimos 12 meses	61	11.9	36	10.6	25	14.7	0.32
Episodios de Sibilancias últimos 12 meses							0.55
Ninguno	3	0.6	1	0.3	2	1.2	
1 a 3	37	7.2	23	6.7	14	8.2	
4 a 12	14	2.7	10	2.9	4	2.4	
Mas 12	7	1.4	2	0.6	5	2.9	
Despertares por sibilancias							0.67
Nunca	39	7.6	21	6.2	18	10.6	
Menos de una vez por semana	17	3.3	13	3.8	4	2.4	
Una o más por semana	5	0.9	2	0.6	3	1.8	
Sibilancias afectan el habla	27	5.3	14	4.1	13	7.7	0.22
Asma alguna vez	57	11.1	43	12.7	14	8.6	0.18
Sibilancias inducidas por ejercicio	70	13.7	42	12.4	28	17.1	0.15
Tos nocturna	185	36.2	126	37.1	59	35.5	0.74
Síntomas severos	27	5.3	18	5.3	9	5.3	0.99

Tabla 3. Videocuestionario ISAAC, ajustado por ciudad.

	Cipolletti n:341		Bariloche n:170		p
	n	%	n	%	
Sibilancias en Reposo					
Alguna vez	84	24.6	31	18.3	0.11
Últimos 12 meses	39	11.4	16	9.4	0.27
Último Mes	16	4.7	4	2.4	0.44
Síntomas Ejercicio					
Alguna vez	74	21.8	30	17.9	0.30
Últimos 12 meses	39	11.4	14	8.2	0.46
Último Mes	24	7.0	5	2.9	0.15
Despertar por Sibilancias					
Alguna vez	23	6.8	14	8.3	0.53
Últimos 12 meses	12	3.5	9	5.3	0.58
Último Mes	4	1.2	5	2.9	0.35
Despertar por Tos seca					
Alguna vez	110	32.4	58	34.3	0.66
Últimos 12 meses	51	15.0	28	16.5	0.70
Último Mes	14	4.1	8	4.7	0.94
Crisis Severa					
Alguna vez	43	12.7	21	12.5	0.96
Últimos 12 meses	15	4.4	12	7.1	0.24
Último Mes	6	1.8	4	2.4	0.59

Tabla 4. Regresión logística variable de sibilancias en últimos 12 meses y sibilancias severas; es univarida y ajustada por ciudad.

		Univariado			Ajustado por ciudad		
		OR	IC95	p	OR	IC95	p
<b>Sibilancias últimos 12 meses</b>							
Sector							
	<i>Privado</i>	Ref			Ref		
	<i>Público</i>	1.09	0.53 -2.24	0.82	0.96	0.45 -2.03	0.91
Género							
	<i>Femenino</i>	Ref			Ref		
	<i>Masculino</i>	0.69	0.33 -1.44	0.32	0.69	0.33 -1.45	0.32
Tabaquismo experimental							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	1.48	0.72 -3.03	0.29	1.43	0.69 -2.94	0.34
Tabaquismo pasivo							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	1.04	0.41 -2.61	0.93	0.84	0.32 -2.23	0.73
Tabaquismo activo							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	2.40	0.23 -24.87	0.46	2.39	0.23 -24.92	0.47
Exposición a Ceniza							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	1.19	0.40 -3.50	0.76	1.14	0.38 -3.42	0.81
Diagnóstico de Asma últimos 12 meses							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	3.93	1.03 -15.08	0.05	4.35	1.12 -16.94	0.03
<b>Sibilancias severas últimos 12 meses</b>							
Sector							
	<i>Privado</i>	Ref			Ref		
	<i>Público</i>	1.65	0.57 -4.79	0.36	1.48	0.49 -4.47	0.48
Género							
	<i>Femenino</i>	Ref			Ref		
	<i>Masculino</i>	0.52	0.16 -1.67	0.27	0.46	0.14 -1.53	0.21
Tabaquismo experimental							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	1.98	0.69 -5.65	0.20	2.02	0.70 -5.82	0.19
Tabaquismo pasivo							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	1.18	0.30 -4.62	0.81	0.92	0.21 -3.99	0.91
Exposición a Ceniza							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	8.57	0.96 -76.53	0.05	8.10	0.90 -72.94	0.06
Diagnóstico de Asma últimos 12 meses							
	<i>No</i>	Ref			Ref		
	<i>Si</i>	0.70	0.17 -2.79	0.61	0.75	0.18 -3.04	0.68

Se ajusto por ciudad: Bariloche (Alto nivel de exposición). Se retiro tabaquismo activo en el análisis de regresión logística de sibilancias severas, debido a las pocas observaciones alcanzadas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Small C, Naumann T. The global distribution of human population and recent volcanism. *Glob Environ Chang Part B Environ Hazards*. 2001;3(3-4):93-109.
2. Wilson T, Stewart C, Bickerton H, Baxter P, Outes V, Villarosa G, et al. Impacts of the June 2011 Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex eruption on urban infrastructure, agriculture and public health. *GNS Science Report*. 2013.
3. Baxter PJ, Bonadonna C, Dupree R, Hards V, Kohn SC, Murphy MD, et al. Cristobalite in Volcanic Ash of the Soufriere Hills Volcano, Montserrat, British West Indies. *Science* (80- ). 1999;283(5405):1142-5.
4. Searl A. Assessment of the exposure of islanders to ash from the Soufriere Hills volcano, Montserrat, British West Indies. *Occup Environ Med*. 2002 Aug 1;59(8):523-31.
5. Buist AS, Bernstein RS, Johnson LR, Vollmer WM. Evaluation of physical health effects due to volcanic hazards: human studies. *Am J Public Health*. 1986;76(March):66-75.
6. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewartf A, et al. The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2013;41(2):73-85.
7. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon A, Bateman E, Cruz A, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;(12):204.
8. Arias SJ, Neffen H, Bossio J, Calabrese C, Videla A, Armando G, et al. Prevalence and Features of Asthma in Young Adults in Urban Areas of Argentina. *Arch Bronconeumol*. 2018;54:134-9.
9. Anderson HR, Favarato G, Atkinson RW. Long-term exposure to air pollution and the incidence of asthma: meta-analysis of cohort studies. *Air Qual Atmos Heal*. 2011 Apr 7;6(1):47-56.
10. Boulet LP, Fitzgerald J, Reddel HK. The revised 2014 GINA strategy report: opportunities for change. *Curr Opin Pulm Med*. 2015;21(1):1-7.
11. Forbes L, Jarvis D, Potts J, Baxter PJ. Volcanic ash and respiratory symptoms in children on the island of Montserrat, British West Indies. 2003;207-12.
12. Horwell CJ, Baxter PJ. The respiratory health hazards of volcanic ash: a review for volcanic risk mitigation. *Bull Volcanol*. 2006;69(1):1-24.
13. Carlsen HK, Gislason T, Benediktsdottir B, Kolbeinsson TB, Hauksdottir A, Thorsteinsson T, et al. A survey of early health effects of the Eyjafjallajökull 2010 eruption in Iceland: a population-based study. *BMJ Open*. 2012;2:343.
14. Carlsen HK, Hauksdottir A, Valdimarsdottir UA, Gíslason T, Einarsdottir G, Runolfsson H, et al. Health effects following the Eyjafjallajökull volcanic eruption: a cohort study. *BMJ Open*. 2012;2(6):1-12.
15. Buist AS, Johnson LR, Vollmer WM, Sexton GJ, Kanarek PH. Acute Effects of Volcanic Ash from Mount Saint Helens of Lung Function in Children. *Am Rev Respir Dis*. 1983;(127):714-9.
16. Benítez S, Sobrino E, Calandrelli M, Gutiérrez L, Irazola VE, Rubinstein AL. Effects of Volcanic Ash on Lung Function in a Cohort of People over 45 Years of Age in Bariloche (Argentina). *Rev Am Med Respir*. 2014;(4):411-6.
17. Zabert I, Benítez S, Zabert GE. Asthma Prevalence among Children Exposed to Volcanic Ashes. *Rev Am Med Respir*. 2015;(4):269-76.
18. Buist A, Vollmer W, Johnson L, Bernstein R, McCamant L. A 4-year prospective study of the respiratory effects of volcanic ash from Mount. *Am J Respir Crit Care Med*. 1986;133.
19. Asher M, Keil U, Anderson H, Beasley R, Crane J, Martinez F, et al. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J*. 1995;8(3):483-91.
20. Mallol J, Solé D, Baeza-Bacab M, Aguirre-Camposano V, Soto-Quiros M, Baena-Cagnani C. Regional variation in asthma symptom prevalence in Latin American children. *J Asthma*. 2010;47(6):644-50.
21. Salmun N. Prevalencia del asma bronquial en la población escolar argentina. Estudio multicentrico. *Arch Ierg Immunol*. 1994;(25):276.
22. Zabert I, Benítez S, Zabert GE. Impacto respiratorio de la exposición aguda a las cenizas volcánica en la Patagonia Argetina: un estudio transversal. *Rev Am Med Respir*. 2019;19(2):112-8.

23. Yano E, Maeda K, Yokoyama Y, Higashi H, Nishii S, Koizumi A. Health effects of volcanic ash: A repeat study. *Arch Environ Health*. 1990;45(6):367–73.
24. Buist A, Martin T, Shore J, Butler J, Lybarger J. The development of a multidisciplinary plan for evaluation of the long-term health effects of the Mount St. Helens eruptions. *Am J Public Health*. 1986;76(SUPPL. 3):39–44.



**FUNDACIÓN**  
Alberto J.  
**ROEMMERS**

---

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