

**VOL 82 - N°2**  
**Mayo - Agosto de 2018**  
Ciudad de Bs. As. Argentina  
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

# Bioquímica y Patología Clínica



**Ronald Ross**

Premio Nobel de Fisiología y Medicina, 1902.



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina.  
Publicación cuatrimestral.





# Analizador Multiparamétrico Totalmente automatizado

## ChorusTRIO

- Dispositivo individual de un solo uso que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo.
- Capacidad multiparamétrica: Procesa hasta 30 diferentes pruebas por corrida.
- La velocidad permite obtener resultados simultáneos de diferentes paneles.
- El primer resultado se obtiene antes de 90 minutos.
- Volumen de muestra:  
La muestra se dispensa manualmente.  
ELISA: Mínimo de muestra 60 uL  
Fijación de complemento: Mínimo de muestra 120 uL



### Enfermedades Infecciosas

Adenovirus IgG	Legionella Pneumophyla 1-6 IgG
Adenovirus IgA	Measles IgG
Chlamydia Pneumoniae IgG	Measles IgM
Chlamydia Pneumoniae IgM	Mycoplasma Pneumoniae IgA
Chlamydia Pneumoniae IgA	Mycoplasma Pneumoniae IgG
Cytomegalovirus IgG	Mycoplasma Pneumoniae IgM
Cytomegalovirus IgG Avidity	Mumps IgG
Cytomegalovirus IgM	Mumps IgM
Epstein-Barr VCA IgG	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr VCA IgM	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr EBNA IgG	Rubella IgG
Epstein-Barr Early Antigen IgG	Rubella IgG Avidity
Epstein-Barr Early Antigen IgM	Rubella IgM
Helicobacter Pylori IgG	Syphilis Screen Recombi
Helicobacter Pylori IgA	Treponema IgG
HSV 1 Screen	Treponema IgM
HSV 2 Screen	Toscana Virus IgG (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IGM	Toscana Virus IgM (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IgG	Toxoplasma IgG
Influenza A IgG	Toxoplasma IgG Avidity
Influenza A IgG	Toxoplasma IgM
Influenza B IgG	Toxoplasma IgA
Influenza B IgG	Varicella IgG
Legionella Pneumophyla IgM	Varicella IgM
Legionella Pneumophyla 1 IgG	

### Autoinmunidad

AtNA-8	Gliadin-B
ENA-6-S	Deaminated Gliadin
ANA Screen	Preptide-G
SM	Deaminated Gliadin
SS-A	Preptide -A
SS-B	tTg-A
Sci-70	tTg-G
Cemp-B	ASCA-A
Jo-1	ASCA-G
dsDNA-G	PR3
dsDNA-M	MPO
CCP	GBM
RF-G	a-TG
RF-M	a-TPO
Cardiolipin-IgG	TG
Cardiolipin-IgM	LKM-1
Beta 2-Glycoprotein-G	AMA-M2
Beta2-Glycoprotein -M	Insulin
Gliadin-A	

### Fijación del Complemento

Bordetella Pertussis	Chlamydia
Borrelia	Echo Virus P Mix
Brucella	Influenza A Virus
Campylobacter Jejuni	Influenza B Virus
Legionella Pneumophyla	Mycoplasma Pneumoniae
Leptospira Mix	Parainfluenza Mix
Listeria Monocytogenes	Q-Fever
Shigella Flexneri	Reovirus
Yersinia Enterocolitica	Respiratory Syncytial Virus
Echo Virus N Mix	Coxsackie Virus A Mix
Poliovirus Mix	Coxsackie Virus B Mix
Adenovirus	Achinococcus

Próximamente disponibles: Borellia IgG - IgM, Vitamina D, Chlamydia Trachomatis IgG - IgA, Parvovirus IgG - IgM, Panel Vacunacion (Tetanos - Difteria - polio IgG), EBV VCA Recombinante.



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "1" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

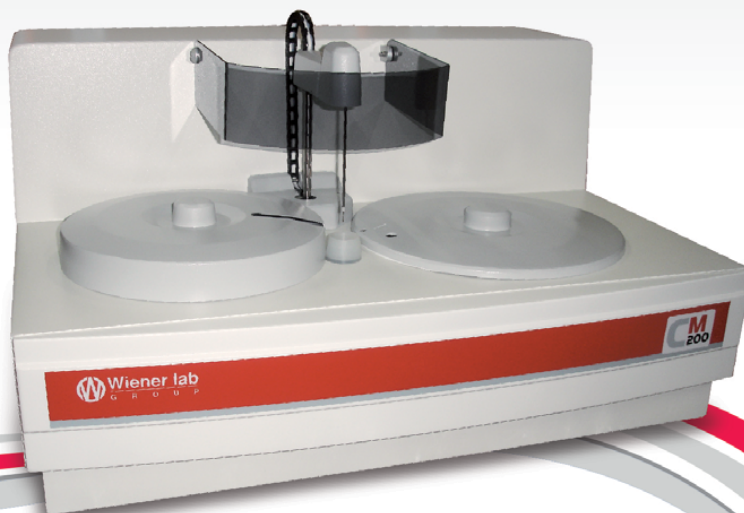
info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

# CM 200

## ¿Qué haría Ud. con 2 horas más 5 veces a la semana?

**Analizador automático  
para bioquímica clínica**

- › Velocidad: 200 test/h
- › Consumo de agua: <0,5 litros/h
- › Posiciones para muestra: 48
- › Posiciones para reactivos: 48
- › Capacidad para resolver urgencias
- › Dilución automática de muestras
- › Control de calidad



El **CM200** es el primer instrumento diseñado específicamente para ser la "primera elección" en el momento que Ud. decida automatizar su rutina de Química Clínica.

**De manejo sencillo y amigable, con capacidad para procesar hasta 200 test/hora**, le asegura años de servicio de rendimiento excelente. Y lo más importante: **sin complicaciones**.

No obstante, es bueno saber que **Wiener lab.** cuenta con la **mayor red de distribución, asistencia técnica y asesoramiento bioquímico del país**. Que todos nuestros reactivos han sido **completamente adaptados al instrumento** siguiendo todas las normativas internacionales y que finalmente, el **CM200 está integralmente producido en la Argentina** por la empresa que lo acompañó desde siempre.

Consulte por nuestra oferta especial y planes de financiación en pesos.

## Y vaya pensando qué hacer en su nuevo tiempo libre



Asistencia Técnica WL



[www.wiener-lab.com](http://www.wiener-lab.com)  
[marketing@wiener-lab.com](mailto:marketing@wiener-lab.com)



Wiener Laboratorios SAIC

Riobamba 2944,  
S2003GSD Rosario, Argentina  
Tel.: +54 341 4329191/6

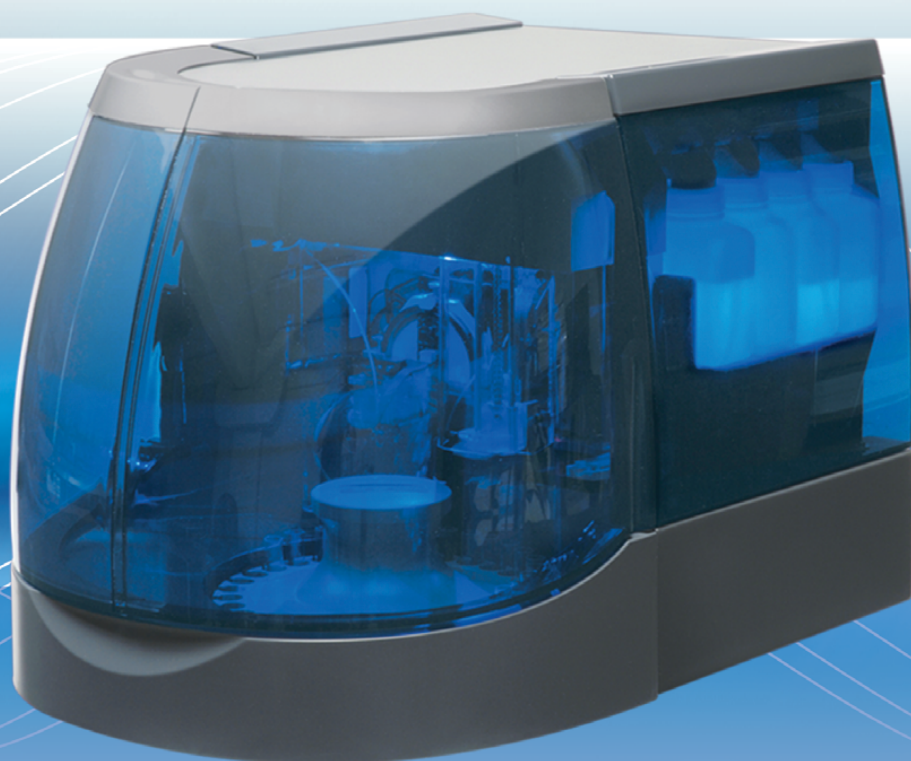
Moreno 1850, 2° piso,  
C1094ABB Buenos Aires, Argentina  
Tel.: +54 11 43754151/4

 **Wiener lab**  
G R O U P  
[www.wiener-lab.com](http://www.wiener-lab.com)

**MINICAP**

**UNA NUEVA DIMENSION EN  
ELECTROFORESIS CAPILAR**

**ÚLTIMA GENERACIÓN**



**MINICAP**

**30 tests / hora.**

**Dos muestras simultáneas.**

**Tubo primario.**

**Lector de códigos de barra.**

**Completa trazabilidad de muestras**

**Transferencia de resultados vía  
módem.**

**Proteínas**

**Inmunotyping**

**Proteínas Alta Resolución**

**Hemoglobina**

**CDT**

**Orinas.**

**sebia**

**Sucursal Buenos Aires**  
Aráoz 86 | C1414DPB | C. A.B.A. | Argentina  
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876 | Fax: 54-11 4856-5652  
bga@bganalizadores.com.ar - [www.bganalizadores.com.ar](http://www.bganalizadores.com.ar)

  
**Sucursal Neuquén**  
Santa Cruz 1629 | CP 8300  
Neuquén | Argentina | Tel.: 0299-4471385  
bganqn@bganalizadores.com.ar



  
**BG Analizadores**  
Soluciones Personalizadas

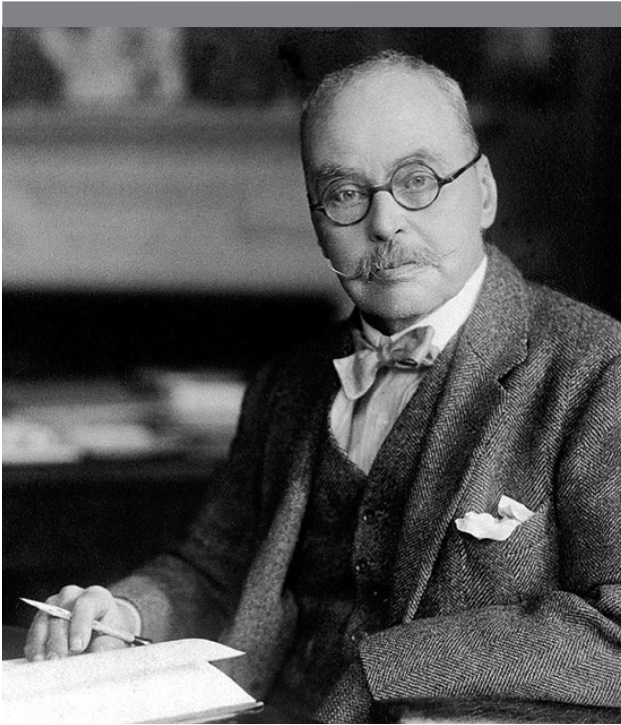
# Bioquímica y Patología Clínica

VOL 82 - N°2  
Mayo - Agosto de 2018  
Ciudad de Bs. As. Argentina  
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina

## SUMARIO

- Pág. 11 **Desarrollo de un sistema de cuantificación de frataxina humana para el diagnóstico complementario y seguimiento de individuos con Ataxia de Friedreich**  
**Development of a system to quantify human frataxin, for the diagnosis and prognosis of individuals with Friedreich's Ataxia**  
Varela, Carolina; Pikielny, Ralph; Balbi, Noelia; Faraj, Santiago; Santos, Javier; Ferrari, Alejandro
- Pág. 22 **Niveles de vitamina D en una población adulta atendida en un hospital de La Plata**  
**Vitamin D levels in an adult population assisted in a public hospital of La Plata, Argentina**  
Prenner, Paola; Marquez, Paulina; Suescun, María Olga; Melillo, Claudia
- Pág. 30 **Moléculas de adhesión y proteínas oncogénicas de virus de papiloma humano en la progresión de cáncer de cuello uterino**  
**Adhesion molecules and oncogenic proteins of human papiloma virus in the progression of cancer of uterine cervix**  
Guerra, Fernando; Rocher, Adriana; Angeleri, Anabela; Díaz, Lili Beatriz; Mendeluk, Gabriela; Quintana, Silvina; Palaoro, Luis
- Pág. 36 **Marcadores Tumorales Séricos en Carcinoma Hepatocelular**  
**Serum Tumor Markers of Hepatocellular Carcinoma**  
Soria, Analía Graciela
- Pág. 45 **Efecto de la inhalación de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires: Alteraciones histomorfológicas, metabólicas y bioquímicas a nivel pulmonar y extra pulmonar en ratones jóvenes y adultos mayores**  
**Effect of inhalation of air particles from Buenos Aires City: Histomorphological, metabolic and biochemical alterations in the lung and extra-pulmonary organs of young and adult mice**  
Orona, Nadia Soledad; Astort, Francisco; Ferraro, Sebastián Ariel; Maglione, Guillermo Alberto; Kurtz, Melisa; Agosta, Eduardo Germán; Mandalunis, Patricia Mónica; Morales, Celina; Tasat, Deborah Ruth
- Pág. 59 **Cursos**



## TAPA

**Ronald Ross fue galardonado en 1902 con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina “por su trabajo sobre la malaria, mediante el cual ha demostrado cómo entra en el organismo y, por lo tanto, ha sentado las bases para una investigación exitosa sobre esta enfermedad y métodos para combatirla”.**

Ronald Ross nació el 13 de mayo de 1857, como el hijo de Sir CCG Ross, un general en el ejército inglés. Comenzó el estudio de medicina en el Hospital St. Bartholomew en Londres en 1875; Ingresó al Servicio Médico de la India en 1881. Comenzó el estudio de la malaria en 1892. En 1894 realizó una investigación experimental en la India basándose en la hipótesis de Laveran y Manson de que los mosquitos están relacionados con la propagación de la enfermedad. Después de dos años y medio de fracaso, Ross logró demostrar el ciclo de vida de los parásitos de la malaria en los mosquitos, confirmando así la hipótesis de Laveran y Manson. En 1899 se unió a la Escuela de Medicina Tropical de Liverpool bajo la dirección de Sir Alfred Jones. Fue enviado inmediatamente a África Occidental para continuar sus investigaciones, y allí encontró las especies de mosquitos que transmiten la mortal fiebre africana. Desde entonces, la Escuela ha sido incansable en sus esfuerzos por mejorar la salud, y especialmente para reducir la malaria en África Occidental. Las investigaciones de Ross han sido confirmadas y asistidas por muchas autoridades distinguidas, especialmente por Koch,

Daniels, Bignami, Celli, Christophers, Stephens, Annett, Austen, Ruge, Ziemann y muchos otros.

Recibió muchos honores además del Premio Nobel, y recibió Membresía Honoraria de sociedades científicas de la mayoría de los países de Europa y de muchos otros continentes. Obtuvo un título de doctor honoris causa en Estocolmo en 1910 en la celebración del centenario del Caroline Institute. Mientras que su vivacidad y búsqueda de la verdad en solitario causaron fricción con algunas personas, disfrutó de un vasto círculo de amigos en Europa, Asia y América que lo respetaban por su personalidad y por su genialidad.

Ross se casó con Rosa Bessie Bloxam en 1889. Tuvieron dos hijos, Ronald y Charles, y dos hijas, Dorothy y Sylvia. Su esposa murió en 1931, Ross la sobrevivió hasta un año después, cuando murió después de una larga enfermedad, en el Ross Institute, Londres, el 16 de septiembre de 1932.

Fuente: adaptado de “Ronald Ross - Biográfico”. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014.

# Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)  
Buenos Aires - Argentina  
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907  
e-mail: info@aba-online.org.ar  
www.aba-online.org.ar  
Registro Nacional de Derechos de Autor N° 034772  
Publicación cuatrimestral

## COMISIÓN DE REVISTA

### Director:

**Dr. Fernando D. Brites**

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

### Secretario Científico:

**Dr. Jaime Kovensky**

Hospital Arturo U. Illia, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza. Argentina.

### Comité Editorial:

**Dr. Orlando Gabriel Carballo**

Hospital Carlos G. Durand. Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

**Dra. María Laura D'Ámbrosio**

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Argentina.

**Dra. Isabel Desimone**

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Universidad Kennedy. Argentina.

**Dra. Cecilia Gasco**

Hospital Carlos G. Durand. Argentina.

**Dr. Julián Verona**

Hospital de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati. Argentina.

### Correctoras:

**Lic. Inés Carozza** (Castellano)

**Lic. María Victoria González Eusevi** (Inglés)

### Secretarios Administrativos:

**Sr. Gastón Goldberg**

**Sr. Jorge Signorelli**

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

## COMISION DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González

Vicepresidente: Dra. Patricia Otero

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dr. Orlando G. Carballo

2º Vocal Titular: Dr. Alberto Villagra

3º Vocal Titular: Dra. María José Rial

1º Vocal Suplente: Dra. María Rugiero

2º Vocal Suplente: Dr. Eduardo Mormandi

3º Vocal Suplente: Dr. Santiago Fares Taie

## COMISION REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dra. Silvia Morilla

Titular 2º: Dra. Estella Meyer

Titular 3º: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita

2º Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

## COMISIONES INTERNAS

### PRENSA Y DIFUSIÓN

Presidente: Dra. Laura Colitto

Secretario: Dr. Santiago Fares Taie

Vocales:

Dr. Eduardo Mormandi

### CERTIFICACION

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Secretario: Dra. Viviana Osta

Vocales:

Dra. María José Rial

### CURSOS

Presidente: Dra. Silvia González

Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola

Vocales:

Dra. María de la Paz Domínguez

Dra. Liliana Maggi

Dra. María José Rial

Dra. Alejandra Svartz

Dra. Marysia Szefer

## COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

Dra. Mónica Aixalá

Dr. Gloria Alvarez

Dra. Liliana Arias

Dra. Alicia Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dr. Gabriel Migliarino

Dr. Eduardo Mormandi

Dra. Raquel Osatinsky

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dra. Sandra Rozental

Dra. Gabriela Santizo

Dra. Nora Slobodianik

## PREMIOS Y DISTINCIONES

Dra. Alicia Blanco

Dr. Fernando Brites

Dra. Nilda Fink

Dr. Nestor Litwin

Dra. Raquel Osatinsky

# REGLAMENTO DE PUBLICACIONES DE BIOQUÍMICA Y PATOLOGÍA CLÍNICA, REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Bioquímica y Patología Clínica (ByPC), Revista de la Asociación Bioquímica Argentina, tiene el objetivo de difundir artículos inéditos y originales relacionados con aplicaciones de la bioquímica clínica en todas sus especialidades en el campo asistencial y de investigación clínica humana, así como en bioquímica animal y vegetal. ByPC está destinada a todos los profesionales de la salud interesados en estas áreas. ByPC se publica cuatrimestralmente en ambos formatos, impreso [ISSN 1515-6761] y electrónico [ISSN 2250-5903], sin costo para los autores y no posee propósitos comerciales.

**La Comisión de Revista de ByPC está integrada de la siguiente manera:**

## **Director:**

Dr. Fernando D. Brites. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

## **Secretario Científico:**

Dr. Jaime Kovensky. Hospital Arturo U. Illia, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza. Argentina.

## **Comité Editorial:**

Dr. Orlando Gabriel Carballo. Hospital Carlos G. Durand. Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

Dra. María Laura D' Ambrosio. Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Argentina.

Dra. Isabel Desimone. Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Universidad Kennedy. Argentina.

Dra. Cecilia Gasco. Hospital Carlos G. Durand. Argentina.

Dr. Julián Verona. Hospital de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati. Argentina.

## **Correctoras:**

Lic. Inés Carozza (Castellano).

Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés).

## **Secretarios Administrativos:**

Sr. Gastón Goldberg.

Sr. Jorge Signorelli.

Los trabajos enviados a la Revista ByPC no deben haber sido publicados en otra revista u órgano de difusión científica nacional o extranjero, tanto en forma impresa como electrónica. Para la preparación de manuscritos, se siguen los requerimientos del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) disponible en <http://www.icmje.org>. Se pueden consultar guías para publicaciones en <http://www.equatornetwork.org>, en castellano en <http://www.espanol.equator-network.org>. Una vez aprobada la publicación del trabajo, ByPC retiene los derechos de su reproducción total o parcial. Quienes deseen reproducir material publicado en la revista deben solicitar permiso a ByPC. Igualmente, para incluir material de otras fuentes con derechos de autor en artículos a publicar en la revista, se debe obtener el correspondiente permiso, y adjuntar copia del mismo al artículo propuesto para publicación. Para mayor información respecto a los derechos de los autores, se recomienda consultar el documento disponible en <http://www.accesoabierto.net/es/node/62>.

## **1. Descripción del proceso de revisión y edición**

La modalidad de revisión es por pares académicos a doble ciego. Específicamente, la Comisión de Revista realiza una primera evaluación del trabajo recibido y lo envía a 2 revisores, quienes deben ser especialistas reconocidos en el área de incumbencia del trabajo y no deben pertenecer a la misma institución de los autores ni guardar alguna relación conocida con los mismos. Los artículos son enviados a los revisores sin el nombre de los autores, lugar de trabajo, dirección de correspondencia, ni los agradecimientos. Los revisores reciben el trabajo completo acompañado de un formulario guía para la realización de la revisión con tópicos que la Comisión de Revista considera imprescindibles para elaborar el dictamen final. La evaluación efectuada por los revisores debe ser remitida a la Comisión de Revista dentro de los 30 días. El dictamen de los revisores es reservado, así como su identidad, y debe fundamentarse de modo explícito. En caso de discrepancia en el dictamen de los revisores, la Comisión de Revista acudirá a un tercer revisor que cumpla los mismos requisitos que los anteriores. El dictamen es decidido por la Comisión de Revista y es comunicado a los autores. Los resultados del dictamen pueden ser: a) Aceptación sin necesidad de modificaciones adicionales; b) Sugerencia de cambios mayores; c) Sugerencia de cambios menores; y d) Rechazo. Las críticas efectuadas al trabajo, así como un eventual rechazo deben estar debidamente justificados. Los resultados de la evaluación son inapelables.

Una vez que el trabajo ha sido aceptado y se ha efectuado la comunicación a los autores, se procede a la corrección de estilo y ortográfica del mismo, tanto en castellano como en inglés. A continuación, se elabora la prueba de galera, la cual es enviada a los autores, junto con instrucciones para efectuar la corrección de la misma. Los autores cuentan con 5 días hábiles para devolver la prueba de galera corregida.

## **2. Requisitos para la remisión de manuscritos**

- Doble espacio en todas las partes del manuscrito.
- Empezar cada sección o componente en una nueva página.
- Revisar la secuencia: título; autores; lugares de trabajo; datos del autor de correspondencia; resumen y palabras clave en castellano; título, resumen y palabras clave en inglés americano; introducción; materiales y métodos; resultados; discusión; agradecimientos, referencias bibliográficas, leyendas de las figuras; tablas; y figuras (cada uno en páginas separadas).
- Las ilustraciones no deben ser más grandes que 203 x 254 mm.
- Incluir los permisos para reproducir material publicado previamente o usar ilustraciones que pueden identificar a las personas.
- Incluir las transferencias de derechos de autor y otras solicitudes.

## **3. Carta**

Carta dirigida al Director de la Revista en la cual se solicita la publicación del artículo. Debe contener el título del trabajo, categoría a la cual pertenece (ver ítem 4), nombre y apellido de todos los autores, dirección, teléfonos y dirección de e-mail del autor de contacto, una dirección de e-mail alternativa, una frase con valor de declaración jurada en la que se manifieste que el artículo cumple con todos los requisitos de publicación en ByPC, y que la última versión del manuscrito ha sido leída y aprobada por todos los autores.

Los trabajos deberán ser enviados por e-mail a la dirección: [revista@aba-online.org.ar](mailto:revista@aba-online.org.ar).

#### 4. Categorías a las cuales deberán ser presentados los trabajos

- a) Artículos originales.
- b) Casos clínicos.
- c) Revisiones.
- d) Cartas al Editor.
- e) Informes.
- f) Guías o Consensos.

#### 5. Preparación de los manuscritos

##### 5.1. Generalidades:

El archivo deberá ser nombrado solamente con el apellido del primer autor y la leyenda “y col.” si correspondiese [Ej.: Pérez y col.]. El texto debe estar dividido en secciones con los títulos de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Los artículos extensos pueden requerir subtítulos dentro de algunas secciones (especialmente en las secciones de Resultados y Discusión) para aclarar sus contenidos. Debe estar escrito en procesador de texto Word, en tamaño de página A4, con márgenes de al menos 25 mm, empleando letra Arial tamaño 12. Usar doble espacio, incluyendo la página del título, resumen, texto, agradecimientos, referencias bibliográficas, tablas individuales y leyendas. Numerar las páginas consecutivamente empezando con la página del título. Poner el número de la página en la esquina inferior derecha de cada página.

##### 5.2. La primera página debe contener:

- a) El título que debe ser conciso pero informativo.
- b) El apellido y luego, separado por coma, los nombres completos de los autores, lo cual debe ir seguido de punto y coma, y los datos del siguiente autor. A continuación del nombre de cada autor, se debe colocar, a modo de superíndice, el número que haga referencia al lugar de trabajo al que pertenece dicho autor. El autor al cual debe ir dirigida la correspondencia debe ser destacado con un asterisco también a modo de superíndice [Ej.: Ramírez, Juan Carlos1\*; Benítez, Laura2; Romero, Mario1.].
- c) Cada lugar de trabajo con el número asignado al autor correspondiente. No se deben emplear abreviaturas. Debe constar primero el nombre del servicio o laboratorio, luego el correspondiente al departamento y por último el de la institución, todo separado por comas y seguido de punto. A continuación, se debe incluir el nombre de la ciudad, la provincia y el país, también separados por comas y con punto final [Ej.: Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.].
- d) Descargos, si hubiere.
- e) Nombre completo del autor responsable de recibir la correspondencia, su lugar de trabajo, la dirección postal, y la dirección de e-mail.
- f) Fuente (s) de financiamiento en la forma de betas, equipos, medicamentos o todos estos.

##### 5.3. La segunda página debe contener:

- a) El resumen en castellano de no más de 250 palabras. Debe estar estructurado de la siguiente manera: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones. Se deben incluir dichos subtítulos de manera explícita. El resumen debe establecer los propósitos del estudio o investigación, procedimientos básicos (selección de los sujetos de estudio o animales de laboratorio; métodos de observación y analíticos), los hallazgos principales y las conclusiones más relevantes. Debería enfatizarse en los aspectos nuevos e importantes del estudio u observaciones. Se recomienda incluir los valores correspondientes a los hallazgos más relevantes acompañados de la forma de expresión de los mismos [Ej.: Media  $\pm$  D.E.] y el tratamiento estadístico, si correspondiese. En el resumen no se deben utilizar abreviaturas.
- b) Palabras clave. Los autores deben colocar, e identificar como tales,

tres a diez palabras clave o frases cortas que servirán para la indicación cruzada del artículo y deben ser publicadas con el artículo.

##### 5.4. La tercera página debe contener:

- a) Título en inglés americano. Debe cumplir los mismos requisitos que el título en castellano.
- b) Resumen en inglés americano (Abstract). Debe cumplir los mismos requisitos que el resumen en castellano e incluir los siguientes subtítulos: *introduction, objectives, materials and methods, results y conclusions*.
- c) Palabras clave en inglés americano (Key words). Deben cumplir los mismos requisitos que las palabras clave en castellano.

##### 5.5. Las páginas subsiguientes, comenzando cada sección en página aparte, deben contener:

- a) Introducción. En la introducción, se debe expresar el contexto o los antecedentes del estudio (por ejemplo, la naturaleza del problema y su importancia) y enunciar el propósito específico u objetivo de la investigación o la hipótesis que se pone a prueba en el estudio u observación. A menudo, la investigación se centra con más claridad cuando se plantea como pregunta. Tanto los objetivos principales como los secundarios deberán estar claros, y deberá describirse cualquier análisis de subgrupos predefinido. Se deben incluir sólo las referencias que sean estrictamente pertinentes y no añadir datos o conclusiones del trabajo que se presenta.
- b) Materiales y Métodos. Debe describir detalladamente los sujetos experimentales, el equipamiento, los reactivos y los procedimientos utilizados, con la inclusión de las marcas registradas cuando corresponda y referencias al utilizar métodos establecidos. Indicar las consideraciones éticas que correspondan si han participado en el estudio seres humanos (Aprobación por comités de ética y obtención de consentimiento informado). Se recomienda dividir la sección Materiales y Métodos mediante el empleo de subtítulos en el caso de ser demasiado extenso. Incluir una sección de “Análisis de datos” en la cual se describan las formas de expresión de los resultados y los métodos estadísticos empleados, si correspondiese. Estos deben ser descriptos con suficiente detalle para permitir que un lector experto con acceso a los datos originales pueda comprobar los resultados que se presentan. Cuando sea posible, cuantificar los hallazgos y presentarlos con los indicadores de medida de error o de incertidumbre adecuados (como los intervalos de confianza). Evitar basarse únicamente en la comprobación de hipótesis estadísticas, como el uso de valores P, que no dan información sobre la magnitud del efecto. Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos deberán corresponder a manuales o artículos clásicos (con los números de página incluidos). Definir también los términos estadísticos, abreviaturas y la mayoría de símbolos. Especificar el *software* utilizado.
- c) Resultados. Presentar los resultados siguiendo una secuencia lógica en el texto, tablas e ilustraciones, y destacando en primer lugar los hallazgos más importantes. No repetir en el texto los datos de las tablas o ilustraciones; resaltar o resumir sólo las observaciones más importantes. Los materiales extra o suplementarios y los detalles técnicos pueden situarse en un anexo donde se puedan consultar para no interrumpir la secuencia del texto. Cuando los datos se resumen en este apartado, los resultados numéricos no sólo deben presentarse los derivados (por ejemplo, porcentajes), sino también los valores absolutos a partir de los cuales se calcularon, y especificar los métodos estadísticos utilizados para analizarlos. Limitar el número de tablas y figuras a las estrictamente necesarias para ilustrar el tema del artículo y para evaluar su grado de apoyo. Usar gráficos como alternativa a las tablas con muchas entradas; no duplicar datos en los gráficos y tablas. Evitar usos no técnicos de términos estadísticos, como “azar” (que implica un dispositivo de aleatorización), “normal,” “significativo,” “correlaciones” y “muestra”. Cuando

sea científicamente adecuado, incluir análisis en función de variables como la edad y el sexo.

d) **Discusión.** Destacar los aspectos más novedosos e importantes del estudio y las conclusiones que de ellos se deducen, contextualizándolos en el conjunto de las evidencias más accesibles. No repetir en detalle datos u otro material que aparezca en la Introducción o en el apartado de Resultados. En el caso de estudios experimentales, es útil empezar la discusión resumiendo brevemente los principales resultados; a continuación, explorar los posibles mecanismos o explicaciones de dichos hallazgos, comparar y contrastar los resultados con los de otros estudios relevantes, exponer las limitaciones del estudio, y explorar las implicaciones de los resultados para futuras investigaciones y para la práctica clínica. Relacionar las conclusiones con los objetivos del estudio, evitando hacer afirmaciones rotundas y sacar conclusiones que no estén debidamente respaldadas por los datos. En particular, evitar afirmaciones sobre los costes y beneficios económicos a menos que el manuscrito incluya datos económicos con sus correspondientes análisis. Evitar afirmaciones o alusiones a aspectos de la investigación que no se hayan llevado a término. Cabe la posibilidad de establecer nuevas hipótesis cuando tengan base, pero calificándolas claramente como tales.

e) **Agradecimientos.** Una o más declaraciones deben especificar (a) Las contribuciones que necesitan agradecerse pero que no justifican una autoría, tales como apoyo general por una jefatura de departamento; (b) Agradecimientos al apoyo técnico; (c) Agradecimiento al apoyo financiero y material, que debe especificar la naturaleza del apoyo; (d) Las relaciones que pueden tener un conflicto de intereses. Las personas que han contribuido intelectualmente al artículo, pero cuyas contribuciones no justifican una autoría, pueden ser mencionadas y sus funciones o contribuciones pueden ser descritas -por ejemplo, "asesor científico", "revisión crítica de los propósitos del estudio", "recolección de información" o "participación en el ensayo clínico"; tales personas deben haber dado sus permisos para ser mencionadas. Los autores son responsables de obtener los permisos escritos de las personas a quienes se agradece, porque los lectores pueden inferir su endosamiento de la información y conclusiones. La ayuda técnica debe ser agradecida en un párrafo aparte de los agradecimientos de otras contribuciones.

## 6. Aspectos que deben tenerse en cuenta en la redacción del manuscrito (Normas Vancouver actualizadas al 2016)

### 6. 1. Citas bibliográficas:

Es la presentación textual o resumida, de ideas expresadas por otros autores que sirven de apoyo al investigador, se contraponen a lo que él dice o aportan mayor información sobre un tema determinado. Las citas son un tipo de texto incrustado en otro texto.

Las citas en estilo Vancouver por lo general utilizan un sistema de secuencia numérica. Son numeradas consecutivamente en el orden de aparición en el texto. Se identifican con números arábigos entre corchetes, ejemplo [1].

#### a) Tipo de citas

- Cita directa: La que se transcribe textualmente. Ejemplo: "La cita textual breve, de menos de cinco renglones, se inserta dentro del texto entre comillas, y el número correspondiente se coloca al final, después de las comillas y antes del signo de Puntuación" [3].

- Cita corta: Menos de cinco renglones.

- Cita larga: Más de cinco renglones. Se escribe fuera del texto, dejando doble espacio y sangría, entre comillas y en bastardilla.

- Cita indirecta: Mención de las ideas de un autor con palabras de quien escribe. Se escribe dentro del texto sin comillas, el número de la referencia se escribe inmediatamente después de citar su idea. Ejemplo: La mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5].

#### b) Tipo de cita según redacción

- Cita integral: Es aquella donde el nombre del autor forma parte de la oración. El nombre se integra dentro del texto. El número de la referencia se escribe después del apellido del autor y antes de citar su idea. Ejemplos:

Como dice Londoño [5] la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín. Cita Indirecta

Según Sanz Pinyol [1] "Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros" Cita directa

- Cita no integral: No se menciona el nombre del autor dentro del texto. Ejemplos:

ε la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5]. Cita Indirecta

"Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros" [1]. Cita directa

### 6. 2. Referencias bibliográficas:

- Conjunto de datos suficientemente detallados que permite identificar un documento. Deben ser numeradas consecutivamente en el orden en que son mencionadas en el texto. Identificar las referencias en el texto, cuadros y leyendas con números arábigos entre corchetes. Las referencias citadas sólo en los cuadros o en las leyendas de las figuras deben ser numeradas de acuerdo con la secuencia establecida por la primera identificación en el texto del cuadro o figura particular.

- Usar el estilo basado en los formatos utilizados por el US National Library of Medicine (NLM) en el Index Medicus. Los títulos de las revistas deben ser abreviados de acuerdo al estilo que utiliza el Index Medicus. Consultar la lista de revistas indizadas en el Index Medicus, publicado anualmente como una separata por la NLM y como una relación en el volumen del mes de enero del Index Medicus.

- Evitar el uso de los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos aceptados pero no publicados deben ser designadas como "en prensa" o "en avance"; los autores deben obtener permiso por escrito para citar tales artículos así como la verificación de que ellos han sido aceptados para publicación. La información de los manuscritos remitidos pero no aceptados debe ser citada en el texto como "observaciones no publicadas" con el consentimiento escrito de los autores.

- No citar una "comunicación personal" a menos que proporcione información esencial no disponible de una fuente pública, en cuyo caso el nombre de la persona y la fecha de la comunicación deben ser citados entre paréntesis en el texto. Para los artículos científicos, los autores deben obtener permiso por escrito y confirmación de exactitud de la fuente de la comunicación personal.

- Las referencias deben ser verificadas por el autor o autores en los documentos originales.

- El estilo de Requisitos Uniformes (de Vancouver) se basa principalmente en el estilo estándar ANSI adaptado por la NLM para su base de datos.

#### a) Artículos de revistas

- Mencionar los seis primeros autores seguidos por et al (Nota: la NLM ahora menciona hasta 25 autores; si hay más de 25 autores, la NLM menciona los 24 primeros, luego el último autor seguido de et al): Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. Ann Intern Med 1996;jun 1; 124 [11]: 980-3.

Como una opción, si una revista lleva paginación continua a través de un volumen (como muchas revistas médicas lo hacen), el mes y el número del volumen pueden ser omitidos: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. Ann Intern Med 1996; 124: 980-3.

- Más de seis autores:

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. Br J Cancer 1996; 73: 1006-12.

- La organización como autor:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guide-lines. Med J Aust 1996; 164:2824.

- Sin autor mencionado:

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J 1994; 84: 14.

- Artículo no escrito en inglés:

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral inftapatellar seneruptur hos tidligere frisk kv-vinne. Tdsskr Nor Laegeforen 1996; 116: 412.

- Volumen con suplemento:

Shen M Zhang QF. Risk assesement of nikel carcinogenicity and occupational lung cancer Environ Health Perspect 1994; 102 Suppl 1: 275-82.

- Número con suplemento:

Paybe DK, Sullivan ME, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 [1 Suppl 2. 89-97].

- Volumen con parte:

Ozben T, Nacirhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann Clin Biochem 1995; 32 (Pt 3): 303-6.

- Número con parte

People GH, Mills SM. One Hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. N Z Med J 1994; 107 (986 PH): 377-8.

- Número sin volumen

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin Orthop 1995; [320]: 110-4.

- Sin número, ni volumen:

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. Curr Opin Gen Surg 1993; 325-33.

- Compaginación en números romanos:

Fisher GA, Sikkie BI. Drug in clinical oncology and hematology. Introduction. Hematol Oncol Clin North Am 1995 Apr 9(2): xi xii.

- Tipo de artículo indizado tal como es requerido:

Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [carta]. Lancet 1996; 347 1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen] Kidney Int 1992; 42: 1285.

- Artículo conteniendo una retractación:

Garcy CE, Schwarzman AL, Rise ML. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retraction de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML. In: Nat Genet 1994; 6.: 426-31]. Nat Genet 1995; 11: 104.

- Artículo retractado:

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retractado en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 31271. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 1083-8.

- Artículo con errata publicada:

Hamlim JA, Kahn AM. Herniorraphy in symptomatic patients following inguinal hernia repair [publicado con errata en West J Med 1995; 162. 2781]. West J Med 1995; 162 28-31.

b) Libros y otras monografías

- Autor (o autores) personal:

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publisher; 1996.

- El editor(es), compilador(es) como autor:

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York; Churchill Livingstone; 1996.

- Una organización como autor y editor:

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medical program. Washington (DC): The Institute; 1992.

- Un capítulo en un libro:

Phillips SJ, Whisnant JP Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Kaven Press; 1995. p. 465-78.

- Libro de congreso:

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 199 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

- Ponencia de un congreso:

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degouler P, Piemme TE, Rienhoff O, editors MEDINFO 92 m Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10, Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

c) Informe científico o técnico

- Emitido por la agencia financiante o auspiciadora:

Smith P, Golladay K Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Oficce of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report N° HHSIGOE169200860.

- Emitido por la agencia ejecutante:

Field MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract N° AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

d) Disertación

Kaplan SJ. Post-hospital home health care; the elderly's access and utilization [dissertation]. St Louis (MO): Washington Univ; 1995.

e) Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignance. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5.529,067, 1995 Jun Material publicado.

f) Artículo de periódico

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 5000 admissions annually. The Washington Post 1996; jun 21; Sect. A:3 (col5).

g) Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St Louis (MO): Mosby-Year Book 1995.

c) Material legal

h) Ley Pública

Preventive Health Amendments of 1993, PubL. N° 103-183, 107 Stat, 2226 [Dec. 14, 1993].

i) Dispositivo no decretado

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong. 1st Sess (1995).

j) Código de regulaciones federales

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441. 257 (1995).

k) Material inédito

- En prensa o "en avance":

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Eng J Med. En prensa 1997

l) Material electrónico

- Artículo de una revista en formato electrónico:

Morse SS. Factors in the emergence of infections diseases. Emerg Infect Dis [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5], 1(1): [24 screens]. Available from: VRL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

- Monografía en formato electrónico:

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM]. Reeves JRT, Malbach H, CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 20. San Diego: CMEA; 1995.

- Archivo computarizado:

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2 Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

## 7. Tablas

Todas las tablas deben agruparse a continuación de las leyendas de las figuras, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números romanos, contener un título y aclaraciones al pie de la tabla, si fuese necesario. Al pie de cada tabla debe figurar la aclaración de las abreviaturas empleadas, así como toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. Las tablas deben ser comprensibles por sí mismas. Para la elaboración de las tablas, se recomienda utilizar el procesador de texto Word y seleccionar el Estilo de Tabla "Tabla básica 1".

## 8. Figuras

Todas las figuras deben agruparse a continuación de las tablas, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números arábigos. Las fotografías y las figuras podrán tener colores, aunque en el caso de las figuras el fondo debe ser blanco. El título de las figuras no debe incluirse junto a las mismas sino en la sección "Leyendas de Figuras". En dicha leyenda debe incluirse el título de la figura, la aclaración de las abreviaturas empleadas y toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. En caso de figuras, fotografías o tablas tomadas de otra publicación, se debe citar la fuente y además enviar el permiso escrito otorgado por el propietario intelectual de dicho material para que el mismo sea publicado en ByPC.

## 9. Revisiones, cartas al editor, informes guías y consensos

Las revisiones, cartas al editor, informes guías y consensos serán usualmente solicitados por el Comité Editorial de la Revista a autores considerados expertos en el campo, la disciplina o la especialidad en cuestión. Sin embargo, serán consideradas para su publicación las que fueran enviadas espontáneamente. Deberán seguir los lineamientos expuestos para la publicación de artículos originales, con la diferencia de que su texto no necesitará contar con resultados y discusión. En el caso particular de las revisiones, deben contener un mínimo de 20 referencias bibliográficas completas y actualizadas a los fines del tema tratado.

## 10. Ortografía y formas de expresión

- Se debe evitar la utilización de palabras en otros idiomas y, cuando ello sea indispensable, deberán ser colocadas en itálica (Ej.: *in vitro*).
- El estadístico "p" debe ser escrito en minúscula.
- En la expresión de los resultados, se debe dejar espacio entre la cifras y los símbolos o las unidades (Ej.:  $p < 0,05$ ;  $32 \pm 2 \text{ g/l}$ ).
- Unidades: se deben emplear las unidades utilizadas más frecuentemente en nuestro medio para cada analito (Ej.: glucosa, urea, ácido úrico, lípidos, lipoproteínas, apoproteínas en mg/dl).
- Las abreviaturas deben ser aclaradas la primera vez que aparecen en el texto ubicándolas entre paréntesis, a pesar de que se trate de abreviaturas ampliamente conocidas (Ej. hemoglobina [Hb.]). A su vez, siempre deben ir seguidas de un punto.
- En la expresión de los resultados, tanto la media como la mediana deben contener la misma cantidad de decimales que sus respectivos desvíos estándar, errores, percentilos o rangos (Ej.  $9,25 \pm 0,78$ ).
- En la expresión de los resultados, la separación entre el entero y los decimales se debe hacer mediante comas y no con puntos lo cual es propio del idioma inglés (3,25), excepto para el resumen en inglés (*Abstract*), en el cual se deben emplear puntos (3.25).
- En el texto, cuando un número aparece al principio de la oración, deberá ser escrito en letras (Ej. Veinte pacientes...).

ARTÍCULO ORIGINAL

# Desarrollo de un sistema de cuantificación de frataxina humana para el diagnóstico complementario y seguimiento de individuos con Ataxia de Friedreich

Varela, Carolina<sup>1</sup>; Pikielny, Ralph<sup>2</sup>; Balbi, Noelia<sup>1</sup>; Faraj, Santiago<sup>1</sup>; Santos, Javier<sup>1</sup>; Ferrari, Alejandro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB), Conicet-UBA.

<sup>2</sup>Departamento de Neurología, Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI).

**Contacto:** Dr. Alejandro Ferrari; Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB), Conicet-UBA, Paraguay 2155 6<sup>to</sup> piso, C.A.B.A. [CP 1113]; alejandro.ferrari@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** la Ataxia de Friedreich es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, caracterizada por la dificultad en el movimiento. La causa es la mutación en el gen que codifica para una proteína mitocondrial denominada frataxina (Fxn), que participa del metabolismo del hierro y el ensamblado de clústeres Fe-S. En todos los pacientes estudiados hasta el momento, hay niveles disminuidos de frataxina, o niveles normales de una proteína no funcional, y se sabe que el tipo de mutación genética condiciona la edad de debut clínico, el avance del cuadro clínico y los niveles de frataxina. Si bien no existe ningún tratamiento definitivo, hay consenso en que la terapéutica futura será la restitución de los valores fisiológicos de Fxn, mediante distintas estrategias moleculares. **Objetivos:** el objetivo de este trabajo fue desarrollar localmente un enzimoimmunoensayo para la cuantificación de Fxn en muestras biológicas, que sea de bajo costo y de relativa sencillez. **Materiales y métodos:** se produjeron la Fxn recombinante y anticuerpos policlonales específicos para dicha proteína, para desarrollar un EIA heterogéneo en fase sólida que permita distinguir individuos con FRDA de individuos sanos, y también de individuos con ataxia no-FRDA, con adecuada sensibilidad y especificidad. **Resultados:** el ensayo permitió distinguir las poblaciones de individuos, estableciéndose como valor de corte 350 fg de Fxn por µg de proteína total. **Conclusiones:** el diseño del ensayo proporciona buena sensibilidad y especificidad (100 % y 95,7 %; respectivamente) y resulta útil para la determinación de Fxn en muestras de sangre.

**Palabras clave:** ELISA, anticuerpos, detección, FRDA, AF.

## Abstract

**Introduction:** Friedreich's Ataxia (FRDA) is a recessive autosomic rare genetic disease, characterized by movement impairment. FRDA is caused by the mutation of the gene that codes for the mitochondrial protein called frataxin (Fxn), which participates in iron metabolism and the assembly of Fe-S clusters. In all FRDA cases studied up to date, individuals have diminished Fxn levels or normal levels but with an impaired Fxn function. In addition, it is well known that the type of mutation determines the age of clinical onset, the progress of the clinical condition and the Fxn levels. Although there is no definitive treatment for individuals with FRDA, there is an international consensus indicating that the main objective should be to restore the physiological values of Fxn, either by promoting mRNA transcription, reducing protein degradation or exogenously administering the protein. **Objectives:** The aim of this work was to develop a low-cost, simple analytical tool based on an enzyme-immunoassay (EIA) for the quantification of Fxn in biological samples. **Materials and methods:** Recombinant Fxn and specific polyclonal antibodies were produced to develop a heterogeneous EIA in solid phase, which allows the distinction of individuals with FRDA from individuals with non-FRDA related ataxias, and individuals without ataxia. **Results:** The assay had adequate sensitivity and specificity. It allowed the distinction of the different populations of individuals under study, establishing a cut-off value of 350 fg of Fxn per µg of total protein. **Conclusions:** The assay design has good sensitivity and specificity (100 % and 95.7 %; respectively) and is useful for Fxn determination in blood samples.

**Key words:** ELISA, antibodies, detection, FRDA, FA.

## Introducción

La Ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, que presenta un cuadro clínico que se caracteriza por la disartria, la ataxia de miembros superiores e inferiores, la escoliosis, el pie cavo, y las dificultades en la visión, la deglución y los trastornos cardiovasculares [1-3]. La base molecular de la patología consiste en mutaciones en el gen *fxn*, el que codifica para la proteína frataxina (Fxn), que pueden ser de dos clases diferentes: por un lado, en un 95 % de los individuos que padecen FRDA, ambos alelos del gen *fxn* poseen expansiones anómalas de un triplete GAA localizado en el primer intrón, que conduce a menores niveles de ARN mensajero y Fxn madura [13]. En el 5 % restante de los individuos que padecen FRDA, solo uno de los alelos del gen *fxn* posee una expansión del triplete GAA, mientras que el otro posee una de varias mutaciones puntuales posibles, constituyendo lo que se conoce como un individuo heterocigota compuesto. Esas mutaciones son variadas, están distribuidas a lo largo de todo el gen *fxn*, y pueden conducir a un cambio del aminoácido codificado, a un corrimiento del marco de lectura o incluso a la producción de una proteína truncada por la aparición de un codón *stop* prematuro [13-17]. Aunque no es demasiado lo que se sabe, hay un vínculo claro entre el nivel de expresión, la funcionalidad de Fxn y el fenotipo resultante [18-21].

No existe ningún tratamiento definitivo para los pacientes con FRDA, salvo los cuidados paliativos. Independientemente de esta clase de tratamientos, existen ciertos desarrollos en marcha cuya finalidad es restituir los valores fisiológicos de Fxn, enfocados a elevar los niveles de ARN mensajero, o a estabilizar los niveles existentes [22-29]. Adicionalmente, hay quienes sugieren que podría restituirse el fenotipo sano aportando Fxn exógena, como es el caso de la iniciativa descrita por Vyas en 2012 [30].

Aunque la utilidad ha sido descrita antes [31-32], en la actualidad no existe ningún laboratorio en el país que realice la determinación de Fxn en muestras biológicas. Asimismo, los *kits* comerciales para valoración de Fxn –todos ellos de fabricación extranjera– no han sido validados con fines clínicos. En este contexto, resulta fundamental contar con una metodología analítica cuantitativa que permita valorar los niveles de Fxn para su uso en el ámbito clínico. Dicho desarrollo contribuiría al diagnóstico a modo de herramienta complementaria, y también serviría para dar seguimiento tanto a los pacientes que ya reciben alguna clase de tratamiento, como a aquellos que reciban alguno de los tratamientos venideros descriptos más arriba.

En este trabajo se desarrolló localmente un ensayo inmunoenzimático (EIA) de bajo costo y de relativa sencillez para la cuantificación de Fxn en muestras biológicas. Dicha metodología fue luego puesta a prueba con una población de individuos sanos, una población de individuos con FRDA y un grupo de individuos con ataxias no-FRDA.

## Materiales y métodos

### Diseño experimental y población

El diseño del ensayo fue de carácter prospectivo, transversal, observacional, con la finalidad de resolver el problema de la cuantificación de Fxn, en un sentido exploratorio. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por Resolución 1475 (CUDAP: EXP-FYB: 0744012/2012).

A los efectos de conducir las pruebas de validación de la metodología, se conformaron tres cohortes: una de individuos con FRDA, otra de individuos sin ataxia y otra con individuos con ataxia no-FRDA. Las cohortes de individuos con ataxia (tanto FRDA como no-FRDA) se conformaron con pacientes voluntarios de la Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI) y del Hospital de Clínicas José de San Martín, que presentaban sintomatología de ataxia. Para la inclusión en alguno de los dos grupos, se consideró como criterio la existencia de un análisis genético que comprobara o descartara la presencia de FRDA. Los individuos sanos (sin ataxia) fueron reclutados de entre la comunidad, siempre y cuando no tuvieran sintomatología ni antecedentes familiares de ataxia. Todos los individuos fueron debidamente informados de los propósitos del proyecto, de sus alcances y limitaciones, y se les hizo firmar un documento de consentimiento informado. En el caso de ser menores, el consentimiento informado fue firmado por la madre, padre o tutor. Los criterios de exclusión de los voluntarios fueron los mismos que se utilizan habitualmente para la selección de donantes de sangre total y componentes sanguíneos en centros de salud, según el Ministerio de Salud de la República Argentina.

### Producción de Fxn recombinante

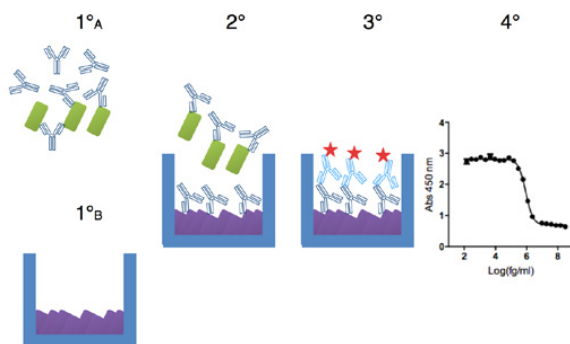
El plásmido conteniendo el gen de la proteína Fxn fue gentilmente cedido por la Dra. Helen Puccio. La expresión de la proteína recombinante fue realizada en *E. coli*, tal como fue descrito antes por este grupo de trabajo [8]. Brevemente, luego de la inducción de la síntesis de la proteína recombinante (rFxn, incluye los residuos 90 a 210 de Fxn), el cultivo de bacterias fue centrifugado a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y el *pellet* fue conservado a -20 °C. Para purificar la proteína, el *pellet* fue resuspendido en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 7,0, EDTA 1 mM. La lisis celular se logró mediante prensa tipo francesa o sonicación. El lisado obtenido fue centrifugado a 16.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La proteína rFxn fue purificada en dos pasos a partir de la fracción soluble: 1) DEAE pH 7,0 eluyendo con gradiente de NaCl; 2) exclusión molecular en G100. Cada partida de proteína fue sometida a un control de pureza e identidad por SDS-PAGE, exclusión molecular analítica acoplada a dispersión de luz (SEC-MALS-QELS) y HPLC/espectrometría de masa (HPLC/ESI-MS), y un control conformacional por fluorescencia y dicroísmo circular (CD) en el UV cercano y lejano (estructura terciaria y secundaria, respectivamente).

### Producción de anticuerpos anti rFxn

La preparación del suero hiperinmune contra rFxn en conejos de la raza Nueva Zelanda, se realizó empleando rFxn pura de concentración conocida, en presencia de adyuvante (hidróxido de aluminio 4 % p/v, hidróxido de magnesio 4 % p/v, en PBS). El título del antisuero se determinó por la técnica de ELISA, tal como se describe en el párrafo siguiente.

Para producir este suero, los conejos recibieron 6 dosis de 100 µg de proteína rFxn purificada, en adyuvante completo de Freund, a razón de una dosis por semana. Al cabo de ese tiempo se tomó a los animales una muestra de sangre por punción de la arteria auricular. El suero se separó por centrifugación (10 minutos a 3.000 rpm) y fue conservado a -20 °C hasta el momento de su uso. El título de anticuerpos específicos contra el inmunógeno se determinó por ELISA. Brevemente, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp) con 0,5 µg/pocillo de rFxn durante 1 hora a 37 °C, luego se lavó con PBS-Tween 20 0,05 % v/v y finalmente se procedió al bloqueo durante 18 hs (O.N.) a 4 °C con PBS + leche en polvo 3 % p/v. La placa se lavó de igual modo, y los sueros de conejo se incubaron en diluciones seriadas al cuarto, partiendo desde 1/1.600. La presencia de anticuerpos específicos se reveló empleando un anticuerpo conjugado (HRPO) comercial (Bethyl) en dilución 1/5.000, incubado en la placa durante 1 h a 37 °C en un volumen final de 100 µl de diluyente (el mismo que el bloqueante). El revelado colorimétrico se realizó empleando un sustrato cromogénico comercial (TMB, Life Technologies) durante por lo menos 10 minutos, y deteniendo la reacción por agregado de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. La lectura de densidad óptica se realizó en un lector de microplacas (TECAN Instruments) y el análisis de las curvas se realizó utilizando el software Graph Pad Prism 6.0.

**Figura 1.** Esquema del diseño del ELISA de competencia en fase heterogénea.



- ▶ Se observa la secuencia de pasos para la detección de Fxn. Paso 1ºA, preincubación del anticuerpo anti-rFxn con la muestra, o batería seriada de estándares de rFxn de concentración conocida; panel 1ºB, recubrimiento de los pocillos de la microplaca de ELISA con rFxn, y posterior bloqueo de sitios inespecíficos; panel 2º, incubación de la mezcla de anticuerpos y estándares/muestra en los pocillos de la microplaca. Panel 3º, detección de anticuerpos unidos, utilizando un conjugado anti-conejo, marcado con HRP. Panel 4º, aspecto general de las curvas sigmoideas de calibración obtenidas.

### Optimización del EIA

Se optimizó un EIA de competencia en fase heterogénea. Este ensayo consiste en preincubar las muestras o estándares de concentración de Fxn con una dilución conocida de anticuerpo anti-Fxn. La mezcla así obtenida se incubó luego en una microplaca cuyos pocillos han sido recubiertos con Fxn, de modo que los anticuerpos que no han sido bloqueados en la preincubación, quedan pegados a la microplaca. Luego del lavado, los anticuerpos unidos se detectan empleando anticuerpos anti-conejo unidos a peroxidasa (HRPO), y posterior revelado con solución de sustrato cromógeno (TMB), y detenido con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Figura 1). La optimización general del ensayo se realizó en una serie de etapas, que se describen a continuación:

- a) determinar la dilución óptima del anticuerpo de conejo-anti-rFxn previamente producido, realizando en una curva de calibración con diferentes diluciones de anticuerpo primario y utilizando 1xEC<sub>50</sub>, 2xEC<sub>50</sub> y 4xEC<sub>50</sub> (valores que surgen de la curva de titulación de anticuerpo primario); a su vez, esta comparación se realizó empleando microplacas sensibilizadas con 0,1 µg de rFxn por pocillo, y 1 µg de rFxn por pocillo; la curva de calibración se realizó desde 0,3 µg/ml en adelante, empleando diluciones 1/2, y la dilución de anticuerpo conjugado fue en exceso (1/5.000);
- b) determinar la masa óptima de rFxn inmovilizada en la microplaca; utilizando el mismo diseño mencionado en el punto anterior, se evaluó el rendimiento del sistema empleando 0,1 µg de rFxn por pocillo, y 1 µg de rFxn por pocillo.
- c) definir cuál es el mejor *buffer* de dilución de muestras y estándares de concentración; en esta fase del trabajo se comparó el rendimiento del diluyente formulado a base de PBS-leche en polvo al 3 % (p/v), respecto de PBS-SFB al 10 % (v/v).
- d) evaluar las condiciones de conservación del anticuerpo primario; para ello, se comparó el decaimiento de la curva de titulación de alícuotas congeladas y descongeladas varias veces a lo largo de un intervalo de tiempo (hasta 5 meses), con el resultado de mantener una alícuota a 4 °C en presencia de 50 % de glicerol y azida sódica 0,02 % (p/v).
- e) evaluar qué calidad de microplacas resultan más apropiadas, en relación con la sensibilidad del método y los niveles de analito en muestras de individuos sanos. En esta fase del trabajo, se compararon placas Nunca Maxisorp de alto pegado, con placas Nunca Polisorp de pegado estándar.
- f) estudiar la estabilidad de la Fxn en muestras de sangre anticoagulada mantenida a 4 °C; para ello, se realizó la determinación de Fxn, tal cual fue optimizada en etapas anteriores, sobre muestras de sangre entera sin procesar, conservadas entre 5 y 0 días a 4 °C. Esta determinación se realizó sobre muestras de donantes sanos, apareando el muestreo de modo que ninguna persona deba someterse a la extracción de sangre más de dos veces durante el ensayo.
- g) determinar la reproducibilidad del ensayo; finalmente, la curva de Fxn fue realizada 3 veces en días distintos, por el mismo operador, con la finalidad de estudiar el coeficiente de variación sobre la medición de Fxn. Se analizó el coeficiente de variación de los parámetros de ajuste (asíntota superior, asíntota inferior, punto medio –denominado EC<sub>50</sub>– y pendiente del punto medio).

### Optimización de la obtención de muestras

La extracción de las muestras biológicas de sangre periférica se realizó por venopunción. Para la puesta a punto, se extrajeron muestras de sangre de 3 dadores sanos (de 6 a 10 ml de sangre por donante, en tubos con EDTA). Sobre esas muestras se analizaron los resultados de diferentes tratamientos de la muestra; entre ellos, se comparó el lisado de sangre entera utilizando 1 % NP 40, 10 % glicerol, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM (partes iguales de sangre y *buffer* de lisis), con la medición de proteína en el plasma obtenido por centrifugación (10 minutos a 3.000 rpm). de sangre anticoagulada con EDTA, y en el paquete total de células obtenido por ese mismo proceso de centrifugación. La concentración proteica total de las muestras biológicas se determinó mediante la técnica del ácido bicinconínico [BCA], y los resultados de las mediciones de Fxn se relativizaron al contenido total de proteínas extraídas.

### Determinación de Fxn en la cohorte de voluntarios reclutados

Para el estudio del rendimiento del ensayo diseñado con individuos con ataxia (FRDA y n-FRDA), se siguieron los lineamientos descritos antes. Todas las muestras fueron conservadas durante no más de 3 horas a 4 °C hasta su procesamiento.

La identidad de todos los pacientes quedó protegida por una codificación dependiente de una clave hexadecimal compuesta por las primeras dos letras del nombre, seguidas de las dos primeras letras del apellido, y los cuatro dígitos del año de nacimiento. La base de datos con los nombres de los pacientes quedó bajo el resguardo de los responsables del proyecto en un archivo codificado con clave de seguridad.

Los datos fueron almacenados en una planilla de cálculo, una para la codificación de los individuos estudiados, y otra con los resultados. El tratamiento estadístico de los datos se realizó verificando primero la homogeneidad de las varianzas con el test de Brown-Forsythe, y –considerando que los resultados mostraron diferencias grandes en las varianzas de los datos– luego con un test de Kruskal-Wallis combinado con una comparación, *a posteriori*, en la que se uso el test de Dunn. Estos cálculos fueron realizados con el *software* Graph Pad Prism 6.0.

## Resultados

### Diseño experimental y población

Durante el transcurso de este proyecto, se conformaron tres cohortes: [1] individuos con FRDA, [2] individuos sanos e [3] individuos con ataxias no-FRDA. Estas cohortes quedaron conformadas por 21, 15 y 8 individuos, respectivamente.

Entre los pacientes con ataxias no-FRDA hubo 5 casos de Ataxia Espinocerebelosa (SCA), un caso de Atrofia Muscular, un caso de ataxia por gluten y un caso de paraparesia espástica. La Tabla I resume las características principales de los voluntarios reclutados.

### Producción de Fxn recombinante

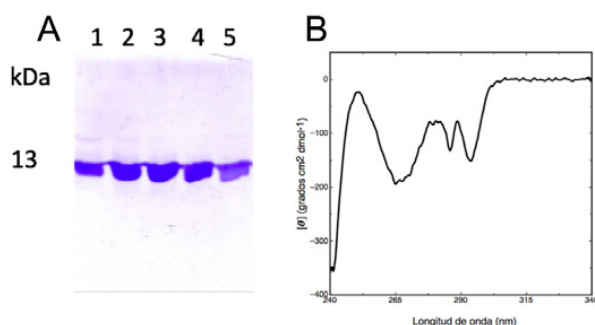
La preparación de rFxn fue realizada conforme lo indicado en la sección de Materiales y Métodos. Como resultado, se obtuvo una proteína de aproximadamente 13 kDa, estable y con alto grado de pureza electroforética, tal como se observa en la Figura 2. La proteína mostró un grado de pureza superior al 98 %, y una concentración de alrededor de 1,2 mg/ml. La proteína fue fraccionada y mantenida a -20°C hasta el momento de su uso. La masa teórica de la proteína purificada y obtenida experimentalmente por ESI-ES coincide perfectamente (13605,15 y 13604,92 Da, respectivamente) indicando la ausencia de modificaciones postraduccionales o proteólisis. El espectro de CD en el UV cercano obtenido es compatible con el esperado para esta variante de Fxn, en su conformación nativa y superponible con los espectros publicados previamente [33]. Es importante notar que las señales de CD en este rango del espectro UV provienen de la existencia de residuos aromáticos de Phe, Tyr y Trp en entornos asimétricos, resultado de la rigidez de la estructura terciaria de la proteína. El espectro de CD en el UV cercano puede considerarse como una “huella digital” del estado conformacional de la proteína purificada.

### Producción de anticuerpos anti rFxn

Conforme a lo descrito, los conejos recibieron 6 dosis de 100 µg de proteína rFxn purificada, en adyuvante completo de Freund, a razón de una dosis por semana. Al cabo de ese tiempo se obtuvieron muestras por punción de la arteria auricular, y la sangre así obtenida fue dejada coagular. El suero se separó por centrifugación y se tituló por ELISA. Los resultados de esa titulación se observan en la figura 3 A (conejo #1) y B (conejo #2), donde se aprecian las curvas de titulación de cuatro sangrías exploratorias (S1 a S4) y de la sangría final (SF).

En las figuras 3 C y D se observan los valores del parámetro EC50, utilizado aquí como indicador del título (en ausen-

**Figura 2.** Resultado de la purificación de la proteína Fxn recombinante.

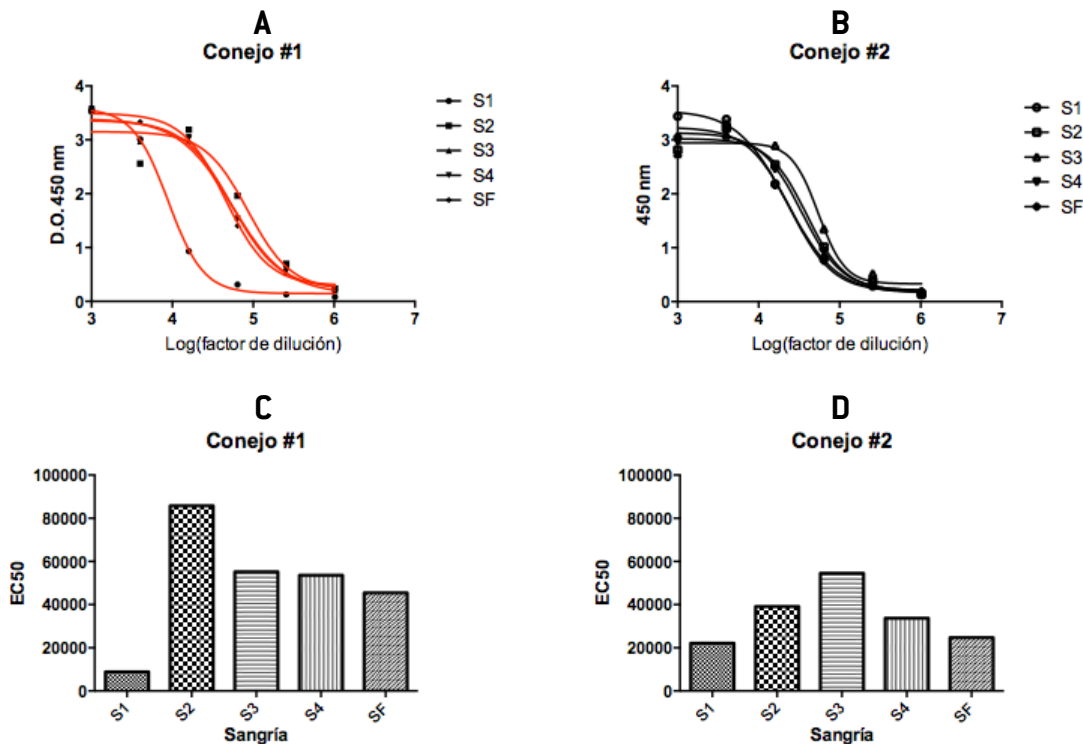


- La figura muestra el resultado de la purificación de rFxn. En el panel A se observan las bandas correspondientes a las sucesivas eluciones de la proteína purificada (calles 1 a 5); a la izquierda se consigna el valor aproximado del peso molecular (13 kDa). En el panel B se muestra un espectro de CD en el UV cercano de la proteína purificada.

**Tabla I.** Resumen de las características de los reclutados.

#	Paciente	Signos	Mutación	Institución	Condición	Fxn (pg/μg)
1	DAOJ1979	AT, ES	Expansión	FLENI	FRDA	0
2	LER01986	AT, ES	Expansión	FLENI	FRDA	0
3	ROMA1968	AT, CA, ES	Expansión	FLENI	FRDA	0
4	NONA1962	AT, CA, ES	Expansión	FLENI	FRDA	299
5	AGM01996	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
6	LADV2001	AT	Expansión	FLENI	FRDA	32
7	ANDV1989	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
8	NIBA1986	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
9	GIBA1990	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
10	DIDE1972	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	0
11	ANDE1976	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	11
12	NIRA1970	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	0
13	MAG01995	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	104
14	JALA1996	AT	Expansión	Htal. Clínicas	FRDA	4
15	VIBE1986	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
16	GLBE1966	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
17	JOBE1963	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
18	ABCH1970	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
19	ALCH1966	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
20	JUOL1951	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
21	FRIP2002	AT	Expansión	FLENI	FRDA	0
22	SOHI1989	---	---	---	Sano	654
23	NAFA1988	---	---	---	Sano	666
24	AIDI1990	---	---	---	Sano	671
25	DAGO1978	---	---	---	Sano	781
26	ADFR1990	---	---	---	Sano	376
27	ALFE1980	---	---	---	Sano	655
28	ELCE1988	---	---	---	Sano	1031
29	MAM01988	---	---	---	Sano	1024
30	MALE1988	---	---	---	Sano	697
31	MAPA1979	---	---	---	Sano	1071
32	MACA1976	---	---	---	Sano	1149
33	JASA1974	---	---	---	Sano	533
34	ERR01979	---	---	---	Sano	798
35	SAFA1988	---	---	---	Sano	707
36	LUDE1988	---	---	---	Sano	1491
37	ESM01984	AM	---	Htal. Clínicas	AM	773
38	JUSA1981	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	437
39	MIAR1969	AT	---	Htal. Clínicas	AG	379
40	RUDA1963	AT	---	Htal. Clínicas	PE	2857
41	NET01961	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	673
42	FRVE1981	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	171
43	MIES1976	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	923
44	JOS01970	AT	---	Htal. Clínicas	SCA	441

► La columna de "signos" se refiere a los signos clínicos más relevantes, como son: ataxia (AT), atrofia muscular (AM), escoliosis (ES) y cardiopatía (CA). La columna "condición" se refiere a la etiología de la patología, e incluye individuos con ataxia de Friedreich (FRDA), con atrofia muscular (AM), ataxia por gluten (AG), paraparesia espástica (PE) y ataxia espinocerebelosa (SCA).

**Figura 3.** Curvas de titulación de sueros de conejo anti rFxn.

► La figura muestra el resultado de la titulación de los sueros de conejos hiperinmunes contra rFxn [panel A, conejo #1; panel B, conejo #2]. Se observa que salvo la primera sangría del conejo #1, todas las fracciones de suero colectadas presentan un título que está por encima de 10.000, utilizando el parámetro EC50 (punto de inflexión de la curva sigmoidea de 4P), como indicador relativo del título. En los paneles C y D se muestra el valor del título [EC50] obtenido a partir de las curvas de titulación de la figura anterior. Se observa que el suero correspondiente al conejo #1 presentó valores superiores en todos los tiempos de sangría, salvo en la primera.

cia de un valor de corte]. Esas figuras muestran que el título obtenido para los sueros correspondientes a ambos conejos no fue equivalente. El suero así obtenido fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Alícuotas de uso se conservaron a  $4-8^{\circ}\text{C}$  en azida sódica y 50% v/v de glicerol.

### Optimización del EIA

Una vez obtenida la fuente de anticuerpos específicos para rFxn (suero de conejo hiperinmune) se procedió a optimizar un protocolo de competencia con preincubación en fase heterogénea. Esta estrategia demostró ser sencilla y relativamente económica, por requerir un único anticuerpo específico no comercial.

A continuación, se describen los principales hallazgos durante la puesta a punto de la metodología, tal como se comentó en la sección de materiales y métodos.

#### a. Dilución óptima del anticuerpo anti-rFxn producido en conejo.

Considerando los datos bibliográficos y la propia experiencia, se eligió una dilución inicial de uso del anticuerpo primario que coincidía con el punto de inflexión de la curva sigmoidea de 4 parámetros, valor al que se denomina EC50 (interacción del anti-rFxn con fase sólida).

A partir del análisis de las curvas de titulación que aparecen en la figuras 2, se determinó ese valor en  $1 / 40.000$

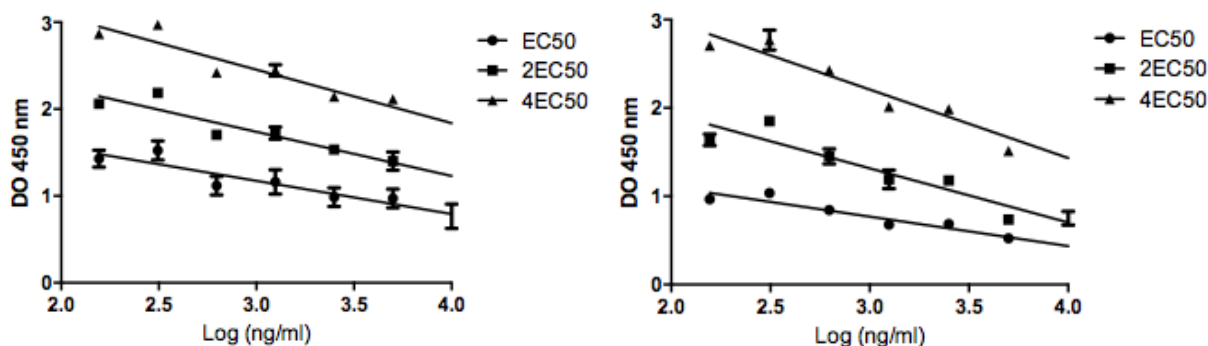
(vale recordar que los sueros que conforman la mezcla definitiva no fueron mezclados en volúmenes iguales, y que el título final predominante es el del conejo #1, por ser las fracciones de volumen preponderante).

Para la selección final de la dilución de anticuerpo que se usará en el ensayo definitivo, se realizó un ensayo de competencia [tal como fue relatado con anterioridad], en el que se emplearon dos concentraciones de rFxn ( $0,1 \mu\text{g/pocillo}$  y  $1 \mu\text{g/pocillo}$ ) unida a la placa, y tres diluciones distintas de suero conejo-anti-rFxn ( $1\times\text{EC}50$ ,  $2\times\text{EC}50$  y  $4\times\text{EC}50$ ), valorando una serie de concentraciones de rFxn estándar soluble desde  $150 \text{ ng/ml}$  en adelante. Los resultados se muestran en las figuras 4 A y B.

En ambos paneles se observa una relación lógica entre las diferentes diluciones de anticuerpo primario (a mayor concentración del anticuerpo, mayor señal), así como una forma lógica para un ensayo competitivo (a mayor concentración de analito en fase líquida, menor señal final). En ambos gráficos se observa que la dilución  $1\times\text{EC}50$  provoca una señal máxima cercana a  $\text{abs} = 1$  a  $450 \text{ nm}$ , algo que resulta óptimo en términos de la linealidad de la relación entre la señal y la concentración de analito, en términos de la Ley de Lambert y Beer. Por ese motivo, se decidió trabajar con  $1\times\text{EC}50$ .

#### b. Masa de rFxn inmovilizada en la microplaca

**Figura 4.** Puesta a punto de la dilución de anticuerpo primario.



► Calibración de la dilución de anticuerpo primario en el ensayo competitivo. Se observan dos cantidades de antígeno sensibilizante, y tres diluciones posibles para el anticuerpo primario. La dilución del anticuerpo conjugado fue siempre la misma [1/5.000].

En relación con la masa de rFxn inmovilizada en la microplaca, las propias Figuras 4 A y B muestran que el incremento en 10 veces la masa de rFxn provoca un aumento proporcional de la señal inferior a lo esperado. En ese contexto, y bajo la premisa bibliográfica de que en los ensayos competitivos la interacción del anticuerpo con el antígeno en fase sólida puede estar privilegiada con respecto a la interacción en fase líquida, se decidió trabajar con la mínima concentración de rFxn, suficiente para proporcionar una señal final significativa [0,1 µg/pocillo].

*c. Buffer de dilución de muestras y estándares de concentración*

De acuerdo con la experiencia previa y con la bibliografía referida al tema, se identificaron dos diluyentes posibles para el ensayo, cuya misión es disminuir las interacciones inespecíficas proteína-proteína y, en consecuencia, minimizar el ruido analítico. Utilizando una dilución de 1xEC50 y 0,1 µg/pocillo de rFXN, se comparó el resultado de diluir los anticuerpos y muestras en PBS + leche descremada en polvo al 3 % p/v, con respecto a PBS + 10 % v/v Suero Fetal Bovino. Los resultados se muestran en la figura 5.

El análisis de la figura muestra que, aunque la forma de las curvas es equivalente, la diferencia entre la asínto-

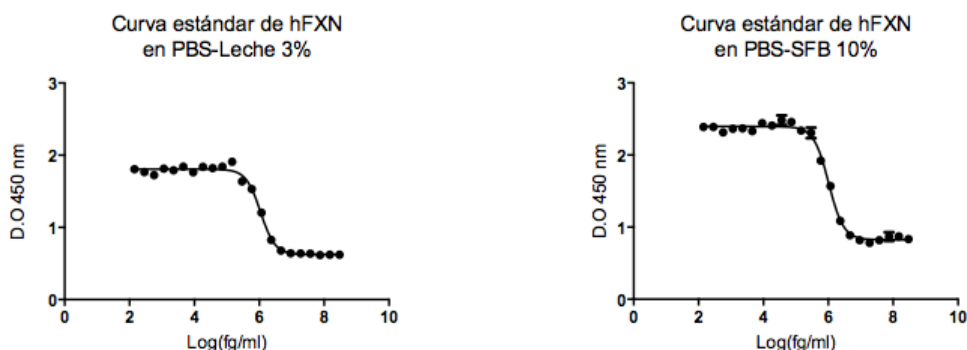
ta máxima y la mínima es considerablemente mayor en el caso del diluyente formulado a base de PBS + SFB 10 % v/v. Por ese motivo, se seleccionó ese diluyente para todos los ensayos posteriores.

*d. Condiciones de conservación del anticuerpo primario*

Considerando la periodicidad con la que el ensayo se iba a realizar [esporádicamente], se decidió evaluar el efecto del uso de una misma fracción de anticuerpos, congelándola y descongelándola cada vez. En la figura 6 se observa claramente una disminución de la señal máxima del título con los ciclos de congelado/descongelado, poniendo en evidencia la necesidad de implementar medidas de preservación.

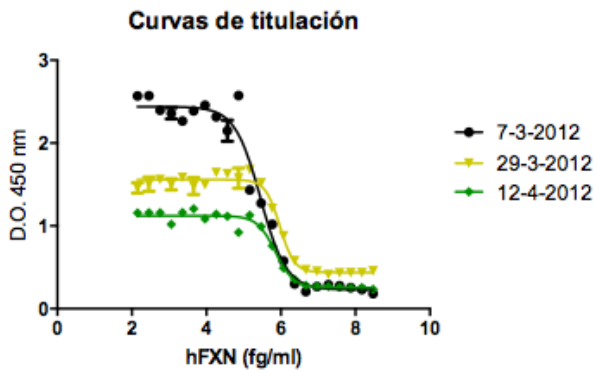
Además, se realizó un experimento control en el que se estudió el efecto de mantener una alícuota durante el mismo período de tiempo que en el ensayo anterior, (35 días) a -20 °C o a 4 °C en presencia de glicerol y azida sódica. Esta última formulación permite evitar los ciclos de congelado y descongelado que, como es sabido, deterioran la actividad del anticuerpo, mientras que la primera permite tener un control de la actividad del anticuerpo congelado. Los resultados se observan en la figura 7, y muestran que una alícuota conservada en presencia de azida sódica y glicerol, retiene prácticamente la misma actividad de anticuerpo que la

**Figura 5.** Comparación de diluyentes de anticuerpos y muestras.



► En la figura se observan las curvas de titulación del mismo suero hiperinmune, contra el mismo antígeno en la misma concentración; la única diferencia fue la composición del buffer diluyente.

**Figura 6.** Estabilidad del anticuerpo primario.



► El gráfico muestra el decaimiento en la actividad de anticuerpo 3 (29 - 3 - 2012) y 5 (12 - 4 - 2012) semanas después de la titulación inicial (7 - 3 - 2012). Estas alícuotas fueron descongeladas 1, 2 y 3 veces respectivamente.

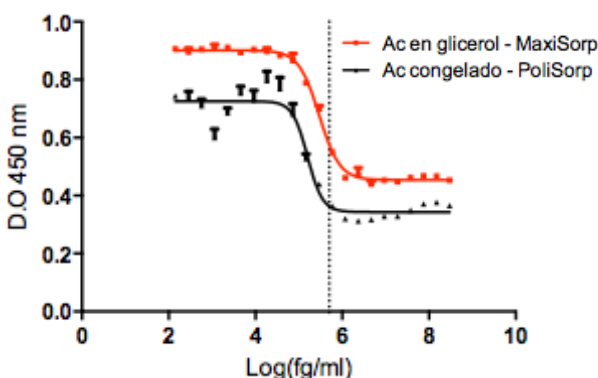
alícuota control conservada a -20 °C.

*e. Calidad de microplacas*

Finalmente, en términos de la puesta a punto del ensayo, se comparó el resultado de utilizar placas de alta capacidad de unión (Nunc MaxiSorp certificadas) con placas de capacidad baja (Nunc PoliSorp, sin certificar). Los resultados de esta experiencia se observan en la figura 8, y muestran que efectivamente el rendimiento del ensayo es considerablemente mejor en las placas de alta unión. Considerando el uso de la determinación, se decidió optar por las placas MaxiSorp certificadas.

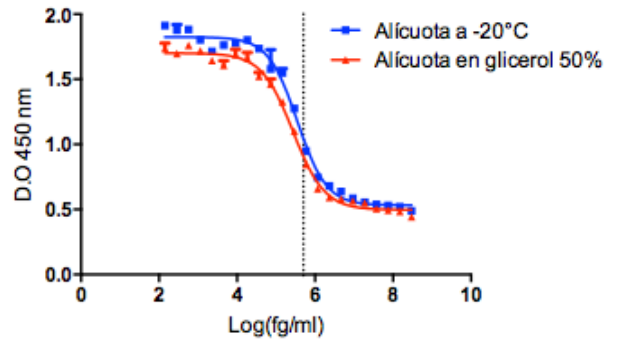
Se convocaron 10 donantes de sangre voluntarios, a quienes se les tomó una muestra el día del ensayo (día 0), y una muestra entre 5 y 1 días antes del ensayo (5 grupos de dos individuos cada uno). Cada una de las muestras fue mantenida a 4 °C hasta el día 0, momento en el que fueron procesadas para la extracción de proteínas, y sometidas a la determinación de proteínas totales y de Fxn. Los resultados fueron expresados en términos de la recuperación

**Figura 8.** Comparación del rendimiento en función de la calidad de las microplacas.



► En la figura se observan las curvas de titulación correspondientes a dos categorías de microplacas de una misma marca (Nunc).

**Figura 7.** Comparación de estrategias de conservación del anticuerpo primario.



► En la Figura se observan las curvas de titulación en las condiciones experimentales elegidas, para una alícuota mantenida en glicerol y temperatura ambiente, y otra alícuota mantenida a -20 °C sin descongelar.

porcentual de Fxn, y todos los datos fueron combinados en un único gráfico, que es el que se muestra en la figura 9. En dicha figura se observa que en 3 días se produce un descenso de un 20 % en la concentración de Fxn, lo que implica un descenso del 6,7 % diario.

*f. Determinación del coeficiente de variación de la medición entre ensayos.*

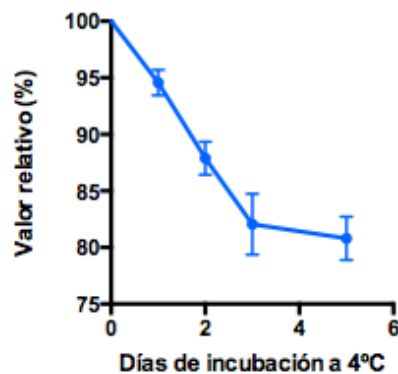
Luego de optimizar las condiciones de ensayo, se realizaron tres experimentos (curvas de calibración) de modo independiente, en días diferentes, por el mismo operador. En cada experimento, se valoró también una muestra normal de un donante voluntario. El resultado de analizar la misma muestra en los tres experimentos arrojó un coeficiente de variación porcentual del 19 %.

*Puesta a punto de obtención y procesamiento de las muestras*

Tal como se describió en el apartado de materiales y métodos, considerando los parámetros optimizados (masa de proteína recombinante recubriendo la placa, dilución de

**Figura 9.** Recuperación porcentual de Fxn en función de la conservación de la muestra a 4°C.

**Recuperación de Fxn en muestras a 4°C**

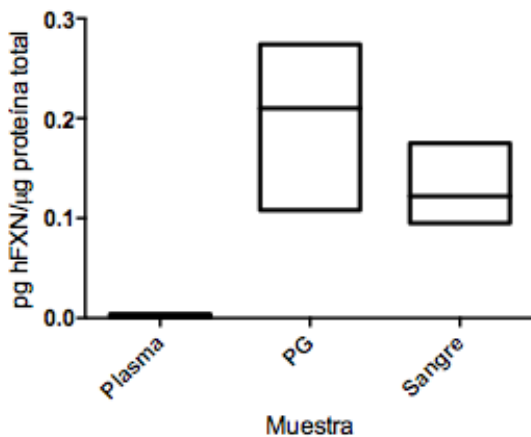


► La f  
día:  
a 4'

► los  
ulada  
de la

obtención (día 0, 100% de señal).

**Figura 10.** Comparación de la recuperación de Fxn en muestras normales.



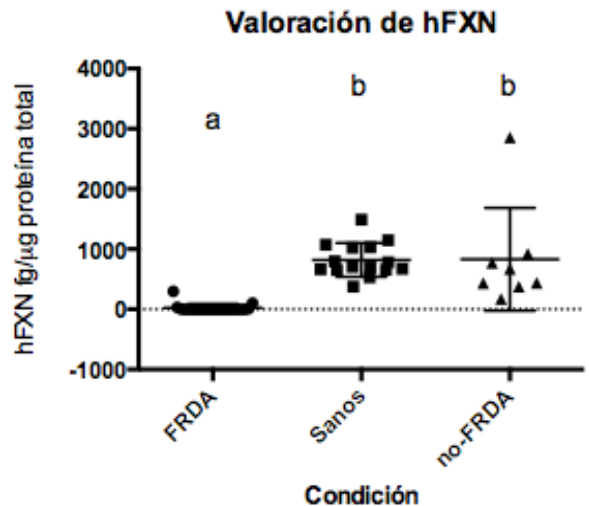
► Valores de Fxn expresados en relación con el contenido total de proteínas de la muestra, para tres tipos de tratamiento de la muestra. En la figura se observa un gráfico de cajas y bigotes, aunque debe destacarse que en esta fase de optimización los datos por grupo son 3 (tres). Se observa el resultado obtenido con plasma, paquete globular (PG) y sangre entera.

anticuerpo primario, calidad de microplacas y diluyente], se procedió a realizar la medición de Fxn en 3 muestras de donantes sanos, sin ataxia ni antecedentes familiares, conforme lo relatado en el apartado de conformación de los grupos de individuos reclutados. Las muestras fueron obtenidas como se indicó previamente, y se separaron en tres fracciones: sangre entera, plasma anticoagulado, y paquete celular obtenido por centrifugación. En la figura 10 se observa el resultado, que indica que no hay Fxn libre en plasma, y que la utilización del paquete globular aumenta levemente los valores obtenidos. Esta diferencia posiblemente sea como consecuencia de la eliminación de las proteínas del plasma, que no aportan Fxn pero influyen en la expresión de resultados (incrementando el valor del divisor), a expensas de la coherencia de los datos (aumenta la dispersión de los valores). En consecuencia, se decidió que toda muestra recibida sería procesada “en fresco”, realizando la extracción de proteínas de sangre total mediante el uso del *buffer* de lisis antes descrito, y las fracciones así obtenidas serían conservadas en nitrógeno líquido hasta su uso.

#### Determinación de Fxn en la cohorte de individuos reclutados

Para validar la metodología en términos analíticos, se realizó la medición en la cohorte de pacientes reclutados, utilizando la metodología optimizada en las etapas anteriores. Todas las muestras fueron procesadas en un único ensayo, y los resultados se resumen en la figura 9. Estos muestran una disminución clara en la concentración de Fxn, detectada en muestras de sangre entera de individuos con FRDA, con respecto a la concentración en muestras de individuos de ambos grupos control (sanos y pacientes con

**Figura 11.** Determinación de Fxn en muestras de individuos sanos, FRDA y con ataxia no-FRDA.



► Valores de Fxn expresados en forma relativa a la masa total de proteínas de la muestra (sangre entera lisada), para los tres grupos de individuos. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) sobre los datos, y un test de Dunn a posteriori. Las letras indican las diferencias significativas, utilizando un test de Tukey con  $\alpha = 0,05$ .

ataxia no-FRDA).

#### Discusión

En términos de la proteína rFxn, los resultados muestran que se logró producir con alta pureza y en un excelente nivel de expresión. Vale la pena mencionar que la variante de longitud completa rFxn1-210 se expresa con niveles muy por debajo con respecto a la variante elegida para este trabajo. Sumado a eso, la versión de longitud completa es mucho más propensa a agregar que la versión 90 - 210, por lo que claramente la rFxn empleada en este trabajo posee características que la vuelven sustancialmente superior que la primera. Los estudios biofísicos confirmaron la identidad y cualidades óptimas para ser utilizada como inmunógeno y como estándar de concentración. Estos estudios biofísicos fueron establecidos como los controles rutinarios a ser realizados sobre cada nuevo lote de rFxn producido, a modo de control de calidad.

La inmunización de conejos con dicho estándar en presencia del adyuvante proporcionó una buena respuesta inmunológica, tal como lo revelan las curvas de titulación de los sueros por ELISA. Dichos títulos fueron cruciales para conseguir alta sensibilidad en el método.

En relación con el proceso de optimización, y como resultado de los diferentes ensayos realizados, se concluyó que las microplacas deben ser de alto pegado, que la sensibilización debe realizarse con 0,1  $\mu$ g de rFxn por pocillo, la dilución del anticuerpo primario debe ser 1xEC50, el diluyente debe ser PBS-SFB 10 %, y la conservación del anticuerpo puede realizarse a 4 °C en presencia de glicerol 50 % y azida sódica 0,02 % p/v. Asimismo, durante esa puesta a punto se concluyó que la muestra de sangre entera es apta para su procesamiento.

**Tabla II.** Resultados de la determinación de FRDA por ELISA y test genético.

ELISA	Test genético		
		FRDA	no-FRDA
FRDA		21	1
no-FRDA		0	22

► La tabla resume los resultados mostrados en la Figura 11, identificando verdaderos y falsos positivos del método de ELISA, así como verdaderos y falsos negativos de ese método.

Finalmente, en términos de los grupos de individuos, se observó que todos los pacientes con FRDA diagnosticada poseen cantidades de Fxn menores a 350 fg Fxn por  $\mu\text{g}$  de proteína total [350 fg/ $\mu\text{g}$ ]. En contraposición, se comprobó que todos los individuos sanos tuvieron valores superiores a esta cifra, y que solo uno de los 10 individuos con ataxias no-FRDA tuvo valores menores a esa cifra. La Tabla II muestra el agrupamiento de datos para el cálculo de la sensibilidad y especificidad analíticas.

De acuerdo con esta Tabla, la sensibilidad del método desarrollado, en relación con la identificación de pacientes con FRDA, es del 100 %, mientras que la especificidad es 95,7 %, pues uno de los 10 individuos con ataxia no-FRDA quedó clasificado como un falso positivo por ELISA.

En conclusión, el método desarrollado es útil para la medición de Fxn en muestras de sangre periférica, y puede ser utilizado como prueba complementaria en el diagnóstico, o herramienta de seguimiento. No obstante, el método diagnóstico de referencia es la prueba genética, y el método aquí descrito no resulta concluyente por sí solo.

#### Conflicto de intereses:

Financiamiento: este trabajo fue parcialmente financiado con fondos UBACYT-PDE 2015.

#### Referencias bibliográficas

1. Delatycki MB, Corben LA. Clinical features of Friedreich ataxia. *J Child Neurol* 2012;27:1133-7.
2. Pandolfo M. Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* 2009;256(Suppl 1):3-8.
3. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Semin Pediatr Neurol* 2003;10:163-172.
4. Lane DJ, Richardson DR. Frataxin, a molecule of mystery: trading stability for function in its iron-binding site. *Biochem J* 2010;426:e1-3.
5. Prischi F, Konarev PV, Iannuzzi C, Pastore C, Adinolfi S, Martin SR, et al. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* 2010;1:95.
6. Qi W, Cowan JA. A structural and functional homolog supports a general role for frataxin in cellular iron chemistry. *Chem Commun (Camb)* 2010;46:719-721.
7. Roman EA, Faraj SE, Cousido-Siah A, Mitschler A, Podjarny A, Santos J. Frataxin from *Psychromonas ingrahamii* as a model to study stability modulation within the CyaY protein family. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834:1168-80.
8. Roman EA, Faraj SE, Gallo M, Salvay AG, Ferreiro DU, Santos J. Protein stability and dynamics modulation: the case of human frataxin. *PLoS One* 2012;7:e45743.
9. Stemmler TL, Lesuisse E, Pain D, Dancis A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem* 2010;285:26737-26743.
10. Tsai CL, Barondeau DP. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* 2010 49:9132-9139.
11. Ye H, Rouault TA. Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* 2010;49:4945-4956.
12. Yoon T, Cowan JA. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* 2004;279:25943-25946.
13. Pandolfo M. The molecular basis of Friedreich ataxia. *Neurologia* 2000;15:325-329.
14. Pandolfo M. Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* 2002;2:87-93.
15. Pandolfo M. Iron and Friedreich ataxia. *J Neural Transm Suppl* 2006;70:143-146.
16. Pandolfo M, Pastore A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol* 2009;256(Suppl 1) 9-17.
17. Saccà F, Marsili A, Puorro G, Antenora A, Pane C, Tessa A, et al. Clinical use of frataxin measurement in a patient with a novel deletion in the FXN gene. *J Neurol* 2012;260:1116-21.
18. Patel PI, Isaya G. Friedreich ataxia: from GAA triplet-repeat expansion to frataxin deficiency. *Am J Hum Genet* 2001 69:15-24.
19. Soragni E, Herman D, Dent SY, Gottesfeld JM, Wells RD, Napierala M. Long intronic GAA\*TTC repeats induce epigenetic changes and reporter gene silencing in a molecular model of Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res* 2008;36:6056-6065.
20. Baralle M, Pastor T, Bussani E, Pagani F. Influence of Friedreich ataxia GAA noncoding repeat expansions on pre-mRNA processing. *Am J Hum Genet* 2008;83:77-88.
21. Lazaropoulos M, Dong Y, Clark E, Greeley NR, Seyer LA, Brigatti KW, et al. Frataxin levels in peripheral tissue in Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol* 2015;2:831-42.
22. Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* 2006;2:551-558.
23. Kim MJ, Kim DW, Jeong HJ, Sohn EJ, Shin MJ, Ahn EH et al. Tat-Frataxin protects dopaminergic neuronal cells against MPTP-induced toxicity in a mouse model of Parkinson's disease. *Biochimie* 2012;94:2448-56.

24. Rai M, Soragni E, Chou CJ, Barnes G, Jones S, Rusche JR et al. Two new pimelic diphenylamide HDAC inhibitors induce sustained frataxin upregulation in cells from Friedreich's ataxia patients and in a mouse model, *PLoS One* 2010;5:e8825.
25. Rai M, Soragni E, Jenssen K, Burnett R, Herman D, Coppola G, et al. HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model, *PLoS One* 2008;3:e1958.
26. Sandi C, Pinto RM, Al-Mahdawi S, Ezzatizadeh V, Barnes G, Jones S, et al. Prolonged treatment with pimelic o-amino-benzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model, *Neurobiol Dis* 2011;42:496-505.
27. Soragni E, Xu C, Cooper A, Plasterer HL, Rusche JR, Gottesfeld JM. Evaluation of histone deacetylase inhibitors as therapeutics for neurodegenerative diseases, *Methods Mol Biol* 2001 793:495-508.
28. Tsou AY, Friedman LS, Wilson RB, Lynch DR. Pharmacotherapy for Friedreich ataxia, *CNS Drugs* 2009;23:213-223.
29. Xu C, Soragni E, Chou CJ, Herman D, Plasterer HL, Rusche JR, et al. Chemical probes identify a role for histone deacetylase 3 in Friedreich's ataxia gene silencing, *Chem Biol* 2009;16:980-989.
30. Vyas PM, Tomamichel WJ, Pride PM, Babbey CM, Wang Q, Mercier J, et al. A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum Mol Genet* 2012;21:1230-47
31. Saccà F, Marsili A, Puorro G, Antenora A, Pane C, Tessa A, et al. Clinical use of frataxin measurement in a patient with a novel deletion in the FXN gene. *J Neurol* 2013;260:1116-21.
32. Pandolfo M. Friedreich ataxia: Detection of GAA repeat expansions and frataxin point mutations, *Methods Mol Med* 2006;126:197-216.
33. Correia AR, Adinolfi S, Pastore A, Gomes CM. Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding, *Biochem J* 2006;398:605-611

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Niveles de vitamina D en una población adulta atendida en un hospital de La Plata

Prener, Paola<sup>1,2\*</sup>; Marquez, Paulina<sup>2</sup>; Suescun, María Olga<sup>2</sup>; Melillo, Claudia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Laboratorio, Hospital Interzonal Especializado en Agudos y Crónicos "San Juan de Dios". La Plata, Argentina.

<sup>2</sup>Cátedra de Endocrinología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

**Contacto:** Prener Paola; Hospital Interzonal Especializado en Agudos y Crónicos "San Juan de Dios", La Plata; prenerpaola@yahoo.com.ar

## Resumen

**Introducción:** el metabolito 25(OH) vitamina D evalúa el estatus de la vitamina D. La vitamina D participa en el metabolismo óseo, homeostasis del calcio, procesos fisiológicos, diferenciación y proliferación celular. **Objetivos:** determinar el estatus de vitamina D en una población adulta en el período 2015 - 2016. Relacionarlo con variables demográficas, condición clínica, época del año, niveles de paratohormona (PTH) y parámetros metabólicos. **Materiales y métodos:** se analizaron 133 muestras de pacientes de ambos sexos (18 a 77 años) atendidos en el Hospital y externos a la institución. Se midió en plasma 25 (OH) vitamina D y PTH (ARCHITECT System, Abbott Diagnostics), en suero calcemia, fosfatemia, glucemia, colesterol, triglicéridos (BT 3000 Plus, CB 400i, Wiener Lab). Se utilizó la clasificación de McKenna y Freaney para definir estatus vitamínico (ng/mL): deseable > 40, hipovitaminosis: 20 - 40, insuficiencia: 10 - 20, deficiencia < 10. **Resultados:** El 6,8 % del grupo tenía niveles > 40,0 ng/dL, un 45,1 % hipovitaminosis, 46,6 % insuficiencia, 1,5 % deficiencia según la clasificación aplicada. Los niveles de vitamina D mostraron diferencia estacional significativa, otoño-invierno y verano. No hubo diferencias según sexo y derivación por especialidad médica. En un 42 % de los pacientes la PTH superaba 68,5 pg/mL, sin correlación con el estatus vitamínico (r Pearson: 0,17). La calcemia y fosfatemia se mantuvieron dentro del rango de referencia y se observó una tendencia del colesterol, triglicéridos y glucemia al aumento en los pacientes con insuficiencia de vitamina D. **Conclusión:** el nivel por debajo del umbral deseable de vitamina D es elevado en la población en estudio. El hiperparatiroidismo secundario sería una consecuencia de la hipovitaminosis. La suplementación adecuada tendría un impacto relevante en la salud, mejorando la calidad de vida en los individuos.

**Palabras clave:** vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, hipovitaminosis.

## Abstract

**Introduction:** Vitamin D participates in bone metabolism, calcium homeostasis, physiological processes, cell differentiation and proliferation. The determination of the 25(OH) vitamin D metabolite allows assessing the status of vitamin D. **Objectives:** The aim of this study was to investigate the vitamin D status in adult subjects in the period 2015 - 2016, and relate it to demographic variables, clinical condition of the patients, season, parathyroid hormone (PTH) levels and metabolic parameters. **Materials and methods:** We analyzed 133 samples from patients of both sexes (18 to 77 years) assisted at a public hospital of La Plata, Argentina. Vitamin D 25(OH) and PTH were measured in plasma (ARCHITECT System, Abbott Diagnostics), whereas calcemia, phosphatemia, glycemia, cholesterol, and triglycerides were measured in serum (BT 3000 Plus, CB 400i, Wiener Lab). The McKenna and Freaney classification was used to define vitamin D status (ng/mL): desirable: > 40, hypovitaminosis: 20 - 40, insufficiency: 10 - 20, and deficiency: < 10. **Results:** 6.8 % of the group had levels > 40.0 ng/mL, 45.1 % had hypovitaminosis, 46.6 % had insufficiency, and 1.5 % had deficiency of vitamin D. Vitamin D levels showed significant seasonal differences between autumn-winter and summer. There were no significant differences according to sex or medical specialty. In 42 % of the patients, PTH exceeded 68.5 pg/mL, with no correlation with the vitamin status (r Pearson: 0.17). Calcemia and phosphatemia remained within the reference range and cholesterol, triglycerides and glycemia tended to increase in patients with insufficient levels of vitamin D. **Conclusion:** The number of patients with levels of vitamin D below the desirable levels is high in the population under study. Secondary hyperparathyroidism would be a consequence of hypovitaminosis. Adequate supplementation would have a relevant impact on patients' health, improving the quality of life in individuals.

**Key words:** vitamin D, secondary hyperparathyroidism, hypovitaminosis.

## Introducción

La vitamina D se presenta bajo dos formas que difieren en la estructura de sus cadenas laterales: vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol) de síntesis cutánea y en menor medida de la dieta y vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) presente en alimentos y suplementos dietarios. La vitamina D es metabolizada principalmente en hígado a 25(OH) vitamina D (25(OH) D) por la enzima 25 $\alpha$ -hidroxilasa. En riñón y otros tejidos (queratinocitos, macrófagos, folículo piloso, colon, mama, médula adrenal, páncreas, cerebro, placenta), ocurre una segunda hidroxilación por la enzima mitocondrial 1 $\alpha$ -hidroxilasa generando el metabolito activo 1,25(OH)<sub>2</sub> D y por la 24 hidroxilasa el metabolito inactivo 24,25(OH)<sub>2</sub> D. La 1 $\alpha$ -hidroxilación es estimulada por paratohormona (PTH), hipocalcemia e hipofosfatemia e inhibida por 1,25(OH)<sub>2</sub> D [1-3]. La 1,25(OH)<sub>2</sub> D, aumenta la absorción intestinal de calcio y estimula la resorción ósea por incremento del número, actividad y diferenciación de los osteoclastos y la disminución de la síntesis de colágeno. En el riñón estimula la expresión de los genes de calbindina y Ca<sup>++</sup>-ATPasa [4].

El hecho de que casi todas las células del organismo presenten receptores nucleares para vitamina D, y que a su vez muchas de estas células posean las enzimas necesarias para la activación de la 25(OH) D a 1,25(OH)<sub>2</sub> D, llevó a crear una nueva línea de investigación que se ocupa de la relación de la hipovitaminosis D con afectaciones no clásicas. Las acciones no clásicas de la vitamina D incluyen regulación del crecimiento y diferenciación de células musculares lisas de los vasos sanguíneos, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, estimulación de la liberación de insulina, regulación del crecimiento y diferenciación de monocitos-macrófagos, células presentadoras de antígenos, células dendríticas y linfocitos, regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular.

Se ha comprobado, a su vez, su acción inmunomoduladora, importante en casos de enfermedades con implicancias en el sistema inmune [5,6].

Estas acciones explicarían la relación del déficit de vitamina D con enfermedades muy frecuentes en todo el mundo como lo son el cáncer, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), anemias, enfermedades autoinmunes, infecciosas, cardiovasculares y procesos de envejecimiento celular. En el caso de la diabetes mellitus la vitamina D por acción no genómica (rápida) estimula la liberación de insulina a nivel de las células  $\beta$  pancreáticas. Se postula entonces a la vitamina D como un agente potenciador de la liberación de insulina y de la conversión de proinsulina a insulina. El subtipo de receptor de vitamina D también sería un factor que debe tenerse en cuenta. En pacientes con DMT2, se comprobó un mejor control glucémico en aquellos con valores adecuados de vitamina D, en comparación con aquellos que presentaban hipovitaminosis D [6,7].

En la mayoría de las células que componen el sistema inmune se ha hallado la expresión del receptor de vitamina D. La producción de 1,25(OH)<sub>2</sub> D por parte de las células del

sistema inmune actúa localmente estimulando la diferenciación de monocitos a macrófagos, células presentadoras de antígenos, células dendríticas y linfocitos, hecho que genera la asociación de la vitamina D con un efecto potenciador del control de infecciones, enfermedades autoinmunes y trasplantes de órganos [6].

El interés de la Vitamina D en pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) radica en las propiedades inmunomoduladoras de esta hormona. Se han relacionado valores deficitarios de 25(OH) D sérica y la expresión de determinados polimorfismos del receptor de vitamina D con recuentos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> bajos, la progresión de la enfermedad y con el incremento de la mortalidad en estos pacientes. La alta prevalencia de deficiencia de vitamina D podría explicarse entre otros factores por la escasa producción cutánea de vitamina D<sub>3</sub>, menor absorción intestinal, aumento en la hidroxilación de 25(OH) D que se traduciría en menores niveles plasmáticos de ésta y acción del virus *per se*, mediada por el efecto inhibitorio de las citoquinas pro inflamatorias como el TNF- y el consumo de 25(OH) D por parte de macrófagos y linfocitos a medida que la enfermedad progresa. También se ha observado deficiencia de vitamina D en VIH tratados con antirretrovirales [8,9].

La presencia de receptores para vitamina D en médula ósea apoya la hipótesis de que la 1,25(OH)<sub>2</sub> D podría estimular directamente a las células hematopoyéticas. A su vez un indicio para tener en cuenta es que el nivel del metabolito activo de la Vitamina D es varias veces mayor a nivel de la médula ósea en comparación con el nivel plasmático. El tejido eritropoyético sería capaz de realizar la conversión de 25(OH) D a 1,25(OH)<sub>2</sub> D, a través de una enzima 1 $\alpha$  hidroxilasa extra-renal. Así altos niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub> D podrían actuar de forma paracrina, uniéndose a sus receptores nucleares. Se han encontrado en pacientes con valores deficientes de vitamina D, valores de ferritina bajos en comparación con aquellos con niveles de vitamina D normales [10].

La relación entre los niveles deficientes de vitamina D y la hipercolesterolemia se encuentra poco establecida, ya que parece ser que la ingesta de calcio tiene una implicancia más directa con los niveles altos de colesterol total [11,12,13].

Una mayor ingesta de calcio puede reducir los niveles de triglicéridos al disminuir su formación hepática y su secreción al modificar el calcio hepatocelular, y a su vez la vitamina D aumenta la absorción del calcio [14]. De Piero Belmonte y col., en su estudio realizado en una población de escolares españoles encontraron una elevada prevalencia de deficiencia de Vitamina D, y un riesgo mayor de presentar cifras elevadas de triglicéridos y tensión arterial en los niños y niñas relacionados [15].

Para evaluar el estatus de la vitamina D se utiliza la determinación del metabolito 25(OH) D, que se considera un indicador de la reserva más que de la función. Esta elección se basa en la estabilidad de este metabolito y su vida media. La concentración de la 25(OH) D es el resultado final del aporte

dietético, la síntesis cutánea y la conversión procedente de depósitos grasos del hígado. La producción de vitamina D a nivel cutáneo posee una gran variabilidad, dependiendo de la estación del año, la latitud, la etnicidad o pigmentación de la piel, la edad y el uso o no de protectores solares [7]. Otro factor es el polimorfismo de genes que se encuentran involucrados en el metabolismo de la vitamina D [8].

Los rangos de referencia de 25(OH) D basados en estudios poblacionales tienen una variación muy significativa dependiendo de los factores de variabilidad antes mencionados. Se ha propuesto que estos rangos se basen en parámetros de la salud, por debajo de los cuales aparecen efectos adversos en el metabolismo.

El valor mínimo de Vitamina D de 30 ng/ml es considerado como el punto en el cual se logra estabilidad en la secreción de PTH y mínima resorción ósea [16]. En Argentina la clasificación más aceptada para definir el estatus de Vitamina D es la de McKenna y Freaney [17]. Es posible que en el futuro se establezca un umbral mayor de niveles deseables de 25(OH) Vitamina D, con el fin de prevenir además de las anomalías fosfocálcicas, las alteraciones no clásicas relacionadas a la Hipovitaminosis D.

El estatus de vitamina D de los pacientes asistidos en este hospital, y fuera de él, por profesionales de distintas especialidades es, hasta la actualidad, en muchos casos desconocido. La implementación de la medida sérica de 25(OH) D en este laboratorio constituye una herramienta que pretende tener distintos alcances: epidemiológico, diagnóstico, de seguimiento, prevención de complicaciones y mejora de calidad de vida.

El objetivo de este trabajo fue determinar el estatus de Vitamina D, a partir de la medición de 25(OH) D sérica, en una población de pacientes adultos ambulatorios atendidos en el Laboratorio Central de un Hospital público de la ciudad de La Plata en el período 2015 - 2016.

### Materiales y métodos

Las muestras analizadas correspondieron a 133 pacientes adultos, ambulatorios, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 18 y 77 años, atendidos en el período 2015 - 2016 en el Laboratorio Central, provenientes de los Consultorios Externos del Hospital para distintas especialidades médicas y pacientes derivados de otras entidades públicas y privadas de la ciudad de La Plata y alrededores. El grupo evaluado estuvo integrado 51 % de mujeres y 49 % de varones, con una edad promedio de 46,6 años y 43 años respectivamente. Las muestras se obtuvieron por punción venosa, con ayuno de 12 horas. Para el dosaje de vitamina D y PTH en el sector de Endocrinología y para la valoración del hemograma en el área de Hematología, se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA al 10 %. Para el análisis de las muestras en el sector de Química Clínica la recolección se realizó en tubos con gel separador de suero. Sólo los plasmas para medida 25 (OH) D se freezaron a -21 °C hasta su procesamiento.

### Metodología

La medición de 25(OH) Vitamina D se realizó por Quimioluminiscencia en un equipo ARCHITECT System de Abbott Diagnostics.

Las muestras se analizaron inmediatamente luego de la separación del plasma, sin congelación previa. La medición de PTH intacta se realizó por quimioluminiscencia en un equipo ARCHITECT System de Abbott Diagnostics.

Se utilizó el contador hematológico multiparamétrico RUBY de empresas Abbott.

Se evaluaron los parámetros: calcemia, fosfatemia, glucemia; perfil lipídico -colesterol (col) total, col-HDL, triglicéridos, col-LDL por cálculo -; creatinina sérica y uremia. Las determinaciones se realizaron en el equipo BT 3000 Plus de Wiener Lab. y CB 400i de Wiener Lab.

Para definir el estatus de vitamina D se utilizó la clasificación de McKenna y Freaney [17].

**Clasificación de McKenna y Freaney.** Utilizada para definir el estatus de vitamina D.

Estatus de vitamina D	25(OH)D (ng/ml)	Definición
<b>Niveles Deseables</b>	> 40	
<b>Hipovitaminosis D</b>	20 - 40	Nivel de vitamina D por debajo del umbral que predispone a la aparición de anomalías incluyendo el hiperparatiroidismo y aumento de marcadores de resorción ósea.
<b>Insuficiencia</b>	10 - 20	Nivel de vitamina D por debajo del cual las anomalías son inevitables.
<b>Deficiencia</b>	< 10	Nivel de vitamina D por debajo del cual las anomalías son evidentes.

### Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos fue realizado con el programa Excel y Graph Pad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA). Los resultados para las variables cuantitativas se expresaron como valores promedios  $\pm$  desvío estándar ( $X \pm DE$ ). Para la comparación de grupos se utilizó el test t Student y Anova paramétricos y no paramétricos según distribución de la variable. Para análisis de correlación se utilizó test paramétricos (Pearson). Se consideró diferencia significativa  $p < 0,05$ .

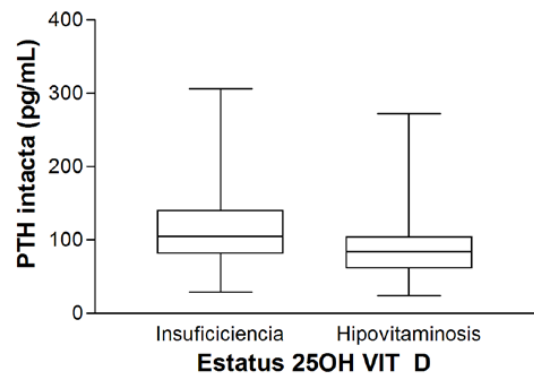
## Resultados

En la tabla 1 se muestra la distribución de pedidos por procedencia. La nomenclatura utilizada en los gráficos y tablas correspondiente a Extrahospitalarios (EH) engloba a los pacientes cuya solicitud fue confeccionada por un profesional de otra institución pública o privada, 14 % (19 / 133) y Sin Datos a aquellos cuya orden de prestación no pudo ser consultada por cuestiones inherentes al funcionamiento del laboratorio, que correspondieron a un 29 % (39 / 133).

Con respecto a los pacientes atendidos por profesionales pertenecientes a Servicios del hospital, Infectología fue aquel que más pedidos de dosaje de 25(OH) vitamina D realizó en el período de muestreo, 41 % (54 / 133). Le siguen en orden de importancia Clínica médica con 8 % (10 / 133) de las solicitudes, Reumatología y Dermatología, ambos con el 3 % (4 / 133) y finalmente Gastroenterología con 2 % (3 / 133). En la tabla I se detallan las muestras solicitadas por procedencia de solicitud y por género del paciente. Puede observarse que las especialidades Infectología y Dermatología atendieron una mayor proporción de pacientes de sexo masculino, en cambio Clínica médica, Reumatología y Extrahospitalarios tuvo un mayor componente femenino. En los grupos Sin Datos y Gastroenterología las proporciones hombres y mujeres fueron similares.

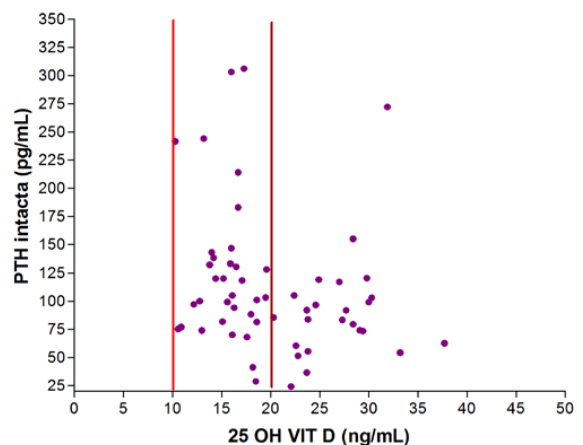
Cuando fueron analizados los niveles de 25 (OH) Vitamina D, según la clasificación de McKenna y Freaney, se encontró que sólo el 6,8 % del grupo tenía niveles deseables de la hormona. En el 93,2 % restante, el estatus deseable de 25(OH) Vitamina D no se alcanzaba, observándose un 45,1 % de hipovitaminosis D, un 46,6 % de insuficiencia y sólo un 1,5 % de deficiencia vitamínica (Tabla II). Los niveles de Vitamina D mostraron sólo diferencias significativas para las estaciones del año otoño-invierno y verano. Los valores se ubicaron dentro del rango de hipovitaminosis alcanzando en muy pocos casos valores deseables (Tabla III). Con respecto al sexo no se observan diferencias en los niveles medios de 25(OH) vitamina D para ninguno de los niveles (Tabla IV).

**Figura 1a.** Niveles medios de PTH intacta en estatus de insuficiencia versus hipovitaminosis.



► [ $p < 0,05$ ,  $N = 58$ ].

**Figura 1b.** Correlación entre los niveles de PTH intacta y 25(OH) vitamina D.



► [ $r$  Pearson: 0,17,  $N = 58$ ].

**Tabla I.** Distribución de solicitudes discriminadas por procedencia y sexo del paciente. N: número de pacientes y % porcentaje.

PROCEDENCIA	MUJERES-N	VARONES-N	TOTAL-N (%)
Clínica Médica	7	3	10 (8)
Infectología	20	34	54 (41)
Dermatología	1	3	4 (3)
Reumatología	3	1	4 (3)
Gastroenterología	2	1	3 (2)
Extrahospitalarios	14	5	19 (14)
Sin datos	20	19	39 (29)
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>47</b>	<b>133</b>

**Tabla II.** Estatus de 25 (OH) vitamina D del grupo total estudiado y edad de los pacientes.

ESTATUS	N	%	25(OH) VIT D X ± DS (ng/mL)	EDAD X ± DS (años)
<b>Deseable</b>	9	6,8	47,2 ± 7,1	42,6 ± 8,8
<b>Hipovitaminosis</b>	60	45,1	27,0 ± 3,8	43,5 ± 14,8
<b>Insuficiencia</b>	62	46,6	15,4 ± 2,6	46,8 ± 13,7
<b>Deficiencia</b>	2	1,5	8,9 ± 1,1	24,0 ± 8,5

► Media ± desvío estándar en ng/mL. 25 (OH) vitamina D: Deseable ≥ 40 ng/ml; hipovitaminosis 20- 40 ng/dL; insuficiencia 10-20 ng/ml; deficiencia 10 ng/ml.

**Tabla III.** Nivel medio de 25 (OH) vitamina D por época del año (media ± desvío estándar).

ESTACIÓN DEL AÑO	25 OH vitamina D (ng/mL)
<b>Otoño-Invierno</b>	19,3 ± 6,7 *
<b>Primavera</b>	22,8 ± 9,9
<b>Verano</b>	28,3 ± 9,7

► \*p < 0.01; 25(OH) vitamina D Otoño-invierno vs verano, test t.

En la tabla V se muestran los niveles medios de 25 (OH) vitamina D discriminados por procedencia. Se observó que no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada nivel de clasificación del estatus vitamínico entre los pacientes derivados por las diferentes especialidades.

Los niveles de PTH se evaluaron en el 44% [58/ 133] del grupo. En el 83% [48/ 58] de los individuos el valor superaba el rango de normalidad (> 68.5 pg/mL). Aunque los niveles medios de PTH fueron significativamente superiores en los pacientes con niveles de Vitamina D insuficientes con respecto a valores de hipovitaminosis, no se encontró correlación entre los niveles de PTH y estatus de Vitamina D (r Pearson: 0,17) (Figura 1 a y b).

Los niveles de calcio y fósforo en suero se mantuvieron dentro del rango de referencia, 8,5 – 10,5 mg/dl y 2,5 - 5,6 mg/dl respectivamente, sin diferencias significativas independientemente del estatus de Vitamina D (Tabla VI).

**Tabla IV.** Estatus de 25 (OH) vitamina D del grupo total según sexo (media ± desvío estándar).

Estatus	Mujeres N (%)	25 (OH) VIT D X ± DS (ng/mL)	Varones N (%)	25 (OH) VIT D X ± DS (ng/mL)
<b>Deseable</b>	4 (5,9)	45,9 ± 2.2	5 (7,7)	48,1 ± 9,8
<b>Hipovitaminosis</b>	30 (44,1)	26,7 ± 3.4	30 (46,2)	27,3 ± 4,3
<b>Insuficiencia</b>	33 (48,5)	15,8 ± 2.6	29 (44,6)	15,0 ± 2.5
<b>Deficiencia</b>	1 (1,5)	9.7	1 (7,7)	8,1

► p > 0,05; 25 (OH) vitamina D varones vs mujeres en todos los grupos, test t.

**Tabla V.** Nivel medio de 25 (OH) vitamina D en ng/mL según estatus y tamaño muestra por especialidad. Media  $\pm$  desvío estándar (número de pacientes).

Estatus	Clínica Médica	Infectología	EH	Sin Datos	Otros	p
<b>Deseable</b>	-	44,1 $\pm$ 1,6 (3)	50,5 $\pm$ 8,2 (5)	40,2 (1)	-	ns*
<b>Hipovitaminosis</b>	26,1 $\pm$ 2,9 (3)	27,0 $\pm$ 4,2 (29)	27,0 $\pm$ 3,6 (8)	27,4 $\pm$ 3,4 (16)	25,6 $\pm$ 5,1 (4)	ns
<b>Insuficiencia</b>	13,8 $\pm$ 3,1 (7)	15,8 $\pm$ 2,6 (21)	15,3 $\pm$ 2,0 (6)	15,6 $\pm$ 2,6 (22)	15,6 $\pm$ 2,4 (6)	ns
<b>Deficiencia</b>	-	9,7 (1)	-	-	8,1 (1)	-

► Otros: dermatología + reumatología + gastroenterología. ns: no significativo: Anova y test de Tukey comparaciones múltiples. \*test-T infectología vs EH. EH: extrahospitalario.

Los valores medios de los parámetros séricos glucosa (glu), colesterol total (col T), triglicéridos (Tg), colesterol HDL (col-HDL) y los parámetros hematológicos hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto), según el estatus de 25 (OH) D, se muestran en la tabla VII. Al analizar los parámetros metabólicos glucemia y colesterol total de los pacientes para los tres estatus, no se hallaron diferencias significativas, aunque hubo una tendencia del colesterol total a estar más elevado en los pacientes con niveles de vitamina D insuficientes. Con respecto a los parámetros que evalúan la función renal, uremia y creatinina, un 4 % de los pacientes (4 / 133) tenían niveles séricos por encima del límite superior del rango de referencia.

### Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos decir que el 93,2 % del grupo estudiado no alcanza niveles deseables de vitamina D, por debajo del cual según la bibliografía se observan anormalidades relacionadas al metabolismo fosfocálcico, como el hiperparatiroidismo y aumento de marcadores de resorción ósea [17]. Según la clasificación de McKenna y Freaney la mayor parte de los individuos evaluados tenían insuficiencia de vitamina D (46,6 %). A partir de este hecho podemos decir que la población analizada sería susceptible a padecer alteraciones tanto del metabolismo fosfocálcico como las relacionadas a las acciones no clásicas de la vitamina D.

Infectología fue el Servicio que más solicitudes de dosaje de 25(OH) Vitamina D realizó en el período de muestreo. Esta tendencia podría asociarse al interés en aumento por la posible asociación entre hipovitaminosis D y VIH, ya que la mayoría de los pacientes estudiados pertenecientes a este servicio corresponden a pacientes portadores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en diferentes estadios de la infección con posible tratamiento antirretroviral de alta eficacia, aunque no se cuenta con datos certeros.

No hubo diferencias significativas en los niveles de los 4 grupos establecidos para el estatus de 25(OH) Vitamina D según el servicio de derivación.

En los pacientes pertenecientes al servicio de Infectología y Extrahospitalarios se observó una tendencia a un mayor número de individuos con hipovitaminosis D. En cambio, las muestras provenientes de Clínica médica y otros servicios tendieron a valores insuficientes de vitamina D.

La edad media de los pacientes fue similar en todos los grupos, con la excepción de aquellos con niveles deficientes, los cuales presentaron una edad media de 29 años. Este hecho no concuerda con estudios como el realizado por Plantalech y col, en el que hallaron una relación entre la edad avanzada y el descenso de los niveles de 25(OH) vitamina D en una población de ancianos hospitalizados de la ciudad de Buenos Aires [18]. La edad media de aquellos pacientes con niveles deficientes

**Tabla VI.** Niveles de calcio y fósforo sérico del grupo total según estatus de 25 (OH) Vitamina D (Media  $\pm$  SD)

Estatus	Calcemia mg/dl	Fosfatemia mg/dl
<b>Deseables</b>	9,55 $\pm$ 0,53	3,78 $\pm$ 0,40
<b>Hipovitaminosis</b>	9,62 $\pm$ 0,49	3,58 $\pm$ 0,51
<b>Insuficiencia</b>	9,43 $\pm$ 1,50	3,52 $\pm$ 0,60

**Tabla VII.** Parámetros metabólicos y hematológicos del grupo según el estatus de 25 (OH) vitamina D. Media  $\pm$  desvío estándar.

<b>Estatus</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Col T (mg/dL)</b>	<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	<b>Col-HDL (mg/dL)</b>	<b>Hb (g/dL)</b>	<b>Hto (%)</b>
Deseables	0,88 $\pm$ 0,13	180 $\pm$ 39,3	141,0 $\pm$ 27,9	56,5 $\pm$ 18,50	14,0 $\pm$ 1,91	44,0 $\pm$ 5,50
Hipovitaminosis	1,02 $\pm$ 0,38	171,1 $\pm$ 35,7	132,4 $\pm$ 130,5	50,9 $\pm$ 14,36	14,1 $\pm$ 1,57	43,9 $\pm$ 4,66
Insuficiencia	1,07 $\pm$ 0,53	189 $\pm$ 43	170,2 $\pm$ 122,5	49,4 $\pm$ 17,12	14,2 $\pm$ 2,28	44,3 $\pm$ 6,70

► Test Anova de comparación múltiple: no significativo. Col T: colesterol total. Col-HDL: colesterol HDL y los parámetros hematológicos hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto).

de vitamina D, puede no haber sido representativa, ya que sólo 2 individuos fueron incluidos en este grupo y esta podría ser la razón de la falta de asociación entre la edad avanzada y la disminución del estatus de vitamina D.

No se observaron diferencias significativas entre los valores de 25 (OH) vitamina D hallados tanto en hombres como en mujeres para los diferentes grupos establecidos por el estatus de vitamina D. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Costanzo y col. en una población adulta de la ciudad de Buenos Aires, en el que no se hallaron diferencias entre sexos en los valores de 25(OH) D durante el invierno, aunque en el verano los varones alcanzaron menores niveles de 25(OH) D que las mujeres [19].

En concordancia con lo observado en la población total, en casi la mitad de las mujeres estudiadas los niveles 25 (OH) vitamina D eran insuficientes, superando al de las pertenecientes al resto de los grupos. En cambio, en el caso de los hombres el porcentaje mayor se ubicó en el estatus de hipovitaminosis D.

El estatus de vitamina D depende principalmente de la exposición solar. Los resultados muestran valores de 25 (OH) vitamina D significativamente superiores en verano respecto al otoño-invierno en coincidencia con lo reportado por Costanzo y col [19].

En cuanto al análisis de los parámetros del metabolismo fosfocálcico, aunque no se estableció una correlación entre los niveles de PTH y 25(OH) vitamina D, los niveles de la vitamina fueron superiores de forma significativa en el estatus de insuficientes. Estos resultados no concuerdan con estudios como el de Chapuy y col., en el que se observó una correlación negativa entre vitamina D y paratohormona [16]. Los niveles plasmáticos de PTH superaron el valor de referencia en casi la totalidad de los pacientes en los que se realizó la medida. Este hallazgo responde a la presencia de un hiperparatiroidismo secundario asociado a niveles de vitamina D inferiores a lo deseable (< 40,0 ng/mL,) coincidiendo en parte con lo publicado por Gómez y col, quienes reportaron hiperparatiroidismo secundario en diferentes proporciones para cifras de vitamina D menores a 18 ng/mL [20]. Niveles bajos de vitamina D estimulan la secreción de PTH, y por otro lado el receptor de vitamina D inhibe la producción de PTH cuya función principal es mantener el calcio plasmático a través de la resorción ósea [21].

Con respecto a las concentraciones de calcio y de fósforo sérico no se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Podría decirse, entonces, que el nivel de 25(OH) vitamina D por debajo del umbral deseable, no se ve reflejado en una alteración de los iones en suero. El metabolismo fosfocálcico lograría compensar los cambios en los niveles de vitamina D, de tal forma que no se vea afectada la homeostasis del sistema [25].

Para los parámetros metabólicos estudiados colesterol total, col-HDL, triglicéridos y glucemia, no encontramos diferencias significativas entre los tres grupos evaluados. Pese a esto, los niveles de triglicéridos como los de colesterol total presentaron una tendencia al aumento en el grupo de pacientes con insuficiencia de vitamina D.

Lacourb y col., determinaron que en ratas con niveles elevados de PTH asociados a hipovitaminosis D, la movilización de triglicéridos estaría alterada causando hipertrigliceridemia [22]. Este hecho explicaría nuestra observación que a medida que el estatus de 25(OH) Vitamina D disminuye, los niveles de triglicéridos aumentan progresivamente.

La ausencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos en los valores de glucemia no se relaciona con estudios realizados anteriormente como el de Chiu y col., en el que pacientes deficientes de vitamina D y con limitada secreción de insulina, muestran una mejora en la síntesis de esta última una vez que la vitamina es suplementada en la dieta, disminuyendo así los niveles de glucosa plasmáticos [14]. Por lo tanto, a medida que el estatus de vitamina D disminuye, los niveles de glucemia de los pacientes deberían aumentar.

Patel y col., en 2010 encontraron una asociación independiente entre la deficiencia de 25(OH) vitamina D y la disminución de los niveles de hemoglobina y la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica [20]. En este trabajo no se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de hemoglobina y hematocrito de los diferentes grupos según niveles de vitamina D.

La población evaluada presentó una función renal conservada. Solo cuatro pacientes presentaron valores de uremia y creatinina por encima de los valores de referencia, dos pertenecían al grupo con insuficiencia de vitamina D y los restantes presentaban hipovitaminosis D.

Trabajos anteriores han reportado una amplia relación entre la función renal alterada y niveles no adecuados de vitamina D.

Li y col., en su estudio realizado en 2004 con ratones observaron que la vitamina D es un potente supresor de la síntesis de renina, un conocido marcador que se asocia con la proteinuria y la progresión de la enfermedad renal [23]. A su vez, la inhibición por la vitamina D de la activación renal de la enzima conversora del TNF-alfa (TACE) contribuye a la protección renal y cardiovascular [24].

En resumen, los resultados obtenidos en la población analizada, permiten concluir que la prevalencia de niveles por debajo del umbral deseable es elevada, llevando a un riesgo aumentado de sufrir alteraciones relacionadas al metabolismo fosfocálcico, que en este caso sería el hiperparatiroidismo secundario sin alteraciones del calcio y fósforo. La edad y sexo del paciente no serían factores que condicionan el estatus de 25(OH) vitamina D y los niveles vitamínicos son mayores en verano que en meses con menor exposición solar, pero sin superar los 40 ng/mL. La hipovitaminosis D no se relacionó con alteraciones en los parámetros metabólicos y hematológicos analizados. La deficiencia/insuficiencia de vitamina D es una realidad a escala mundial, incluida la población argentina. Como se ha sugerido, la corrección de dicho déficit con la suplementación adecuada de vitamina D tendría un impacto positivo en la salud evitando complicaciones y mejorando la calidad de vida.

#### Agradecimientos

A los profesionales, personal técnico y administrativo del Laboratorio Central del Hospital.

#### Referencias bibliográficas

- Trincado MP. Hipovitaminosis D review. *Rev. Med. Clin. Condes* 2013;24(5):813-817.
- Barberán M, Aguilera G, Brunet L, Maldonado F. Déficit de Vitamina D. Revisión epidemiológica actual. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 2014;25:127-34.
- Puche RC. Sobre la prevalencia de Hipovitaminosis D en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2015;75:183-186.
- Shoback D, Sellmeyer D y Bikle DD. Enfermedad ósea metabólica. Editores Gardner D, Shoback D. Greenspan. *Endocrinología Básica y Clínica*. 9ª edición. Mc Graw Hill; 2012. p. 227-281.
- Sedlinsky C. Acciones no clásicas de la vitamina D. *Revista SAEGRE* 2011;8(2):20-24.
- Constanzo P, Salerni H. Hipovitaminosis D: afectaciones no clásicas. *RAEM* 2009;46(1):3-23.
- De Oliveira V, Muller Lara G, Dutra Leurenco E, Boff Bruna D, Stauder Zirbes G. Influencia de la vitamina D en la salud humana. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2014;48(3):339-47.
- Jimenez Cervero M. Prevalencia de deficiencia de vitamina D y de los factores de riesgo asociados en una cohorte española de adultos infectados por VIH. Efecto del tratamiento antirretroviral. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid 2011. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=99163>.
- Rodríguez M, Daniels B, Guenawardene S, Robbins G. High frequency of vitamin D deficiency in ambulatory HIV-Positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25: 9-14.
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA et al. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 2010;89:447-452.
- Querales Marvil I, Cruces María E., Rojas Susana, Sanchez Lissette. Deficiencia de vitamina D: ¿Factor de riesgo de síndrome metabólico? *Rev Med Chile* 2010;138:1312-1318.
- Zemel M, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel P. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB Journal* 2000;14:1132-8.
- Melanson E, Sharp T, Schneider J, Donahoo W, Grunwald G, Hill J. Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;77:1448-52.
- Cho HJ, Kang HC, Choi SA, Ju YC, Lee HS, Park HJ. The possible role of Ca<sup>2+</sup> on the activation of microsomal triglyceride transfer protein in rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1418-23.
- Bordallo CF, Saavedra MS. Controversias en la medición de 25 (OH) vitamina D: comparación de dos metodologías. *RAEM* 2011;48(2):69-77.
- Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int*. 1997; 7:439-43.
- MacKenna M, Freaney R. Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 1998; 8(Suppl):S3-S6.
- Plantalech L, Knoblovits P, Cambiazzo E, Balzaretto M, Oyamburu J, Bonetto A y col. Hipovitaminosis D en ancianos institucionalizados de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 1997;57:29-35.
- Costanzo PR, Elias NO, Rubinsztein J, Basavilbaso García N, Piacentini R, Salerni HH. Variaciones estacionales de 25 (OH) vitamina D en jóvenes sanos y su asociación con la radiación ultravioleta en Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 2011;71:336-342.
- Patel NM, Gutierrez OM, Andress DL, Coyne DW, Levin A, Wolf M. Vitamin D deficiency and anemia in early chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77(8):715-20.
- Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1706S-9S.
- Lacour B, Basile C, Drueke T, Funck-Brentano JL. Parathyroid function and lipid metabolism in the rat. *Miner Electrolyte Metab* 1982;7:157-65.
- Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90(1-5):387-392.
- Dusso A, Tokumoto M. Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney Int* 2011;79(7):715-729.
- Spivacow Francisco R., Durán Ana, Zanchetta María B. Hiperparatiroidismo primario normocalcémico. *Medicina (Buenos Aires)* 2014;74:457-461.

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Moléculas de adhesión y proteínas oncogénicas de virus de papiloma humano en la progresión de cáncer de cuello uterino

Guerra, Fernando; Rocher, Adriana; Angeleri, Anabela; Díaz, Lili Beatriz; Mendeluk, Gabriela; Quintana, Silvina; Palaoro, Luis.

Hospital de clínicas José de San Martín, Departamento de Bioquímica Clínica, Área Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

**Contacto:** Dr. Luis Palaoro. Hospital de Clínicas "José de San Martín", Departamento de Bioquímica Clínica, Área Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; INFIBIOC - Departamento de Patología del Hospital de Clínicas José de San Martín - Instituto Fares-Taie [Mar del Plata]. luispalaoro@yahoo.com.ar

## Resumen

**Introducción:** la invasión y metástasis de los carcinomas es regulada por diferentes vías de señalización, algunas de las cuales (Wnt/beta catenina, TGF $\beta$ -R) regulan la transición epitelio-mesénquima (EMT). En el cáncer de cuello uterino, la proteína E6 de los virus de papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) desestabiliza las uniones adherentes, primer paso en el proceso invasivo. **Objetivos:** a) Investigar EMT en el cáncer de cuello uterino y b) Estudiar la expresión de beta catenina durante el proceso de transformación neoplásica, con relación a la expresión de E6 de HR-HPV. **Materiales y métodos:** Se utilizaron piezas quirúrgicas de cuellos uterinos de archivo con diversos cánceres y se practicó inmunohistoquímica con anticuerpos anti Beta Catenina, Vimentina, Alfa-Actina de Músculo liso ( $\alpha$ SMA) y E6 de HPV 16/18. **Resultados:** Beta catenina: patrón periférico (membranoso) en los 2/3 superiores de lesiones de bajo grado (LSIL) [12/12] y citoplasmático en el 1/3 inferior. Negativa en adenocarcinoma (Adenok) [15/15] y carcinoma pavimentoso (CaP) [25/25]. Vimentina y  $\alpha$ SMA: negativas en todas las lesiones. E6 de HPV 16/18: positiva en las células epiteliales patológicas todas las muestras con HPV 16/18: adenocarcinoma *in situ* (AIS) 6/6, Adenok [11/11], Carcinoma pavimentoso (CaP) [9/9]. **Conclusiones:** la vía Wnt/beta catenina y EMT no están activados en los cánceres de cuello uterino. E6 de HR-HPV desestabiliza las uniones adherentes y desencadena los procesos invasivos. Probablemente, la vía EGFR/PI3K/Akt/mTOR completaría el proceso de malignización; este ítem requiere continuar con los estudios de los procesos de activación de esta ruta.

**Palabras clave:** moléculas de adhesión, E6, beta catenina, vimentina, alfa-actina de músculo liso, EMT, vía EGFR/PI3K/Akt/mTOR.

## Abstract

**Introduction:** The invasion and metastasis of carcinomas are regulated by different signaling pathways, some of which (Wnt/beta catenin, TGF $\beta$ -R) regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT). In cervical cancer, the E6 protein of the high-risk human papillomavirus (HPV) destabilizes adherent junctions, the first step in the invasive process. **Objectives:** a) To investigate EMT in cervical cancer and b) to study the expression of beta-catenin during the neoplastic transformation process, in relation to E6 protein expression. **Materials and methods:** Surgical specimens from various cervical cancers were used and immunohistochemistry was performed with antibodies to Beta catenin, Vimentin, Alpha smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA) and E6 from HPV 16/18. **Results:** Beta catenin showed a peripheral (membranous) pattern in the upper 2/3 of Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) [12/12] and a cytoplasmic one in the lower 1/3. Negative in adenocarcinoma (Adenok) [15/15] and Squamous carcinoma [25/25]. Vimentin and  $\alpha$ SMA were negative in all lesions. All pathological epithelial cells were positive for HPV 16/18: adenocarcinoma *in situ* (AIS) 6/6, Adenok [11/11], Squamous carcinoma [9/9]. **Conclusion:** The Wnt / beta catenin pathway and EMT are not activated in cervical cancers. The HPV E6 protein destabilizes adherent joints and triggers invasive processes. Probably, the EGFR / PI3K / Akt / mTOR pathway would complete the malignization process. It is necessary to continue the investigation of this route.

**Key words:** adhesion molecules, E6, beta catenin, vimentin, smooth muscle alpha-actin, EMT, EGFR / PI3K / Akt / mTOR pathway.

## Introducción

El cáncer de cuello uterino se relaciona con la presencia del virus del Papiloma Humano (HPV) [1]. La evolución desde lesiones de bajo grado (LSIL) a carcinomas depende de varias etapas, como la expresión de oncoproteínas virales (E5/E6/E7), que aumentan el número de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e interfieren con las proteínas de genes supresores (p53/pRb) y la integración del ADN viral al ADN celular, además de los cambios epigenéticos no del todo aclarados [2]. Sin embargo, en el proceso invasivo deben activarse diferentes vías de señalización; las vías Wnt/Beta catenina y la del receptor del factor de crecimiento tumoral beta (TGF $\beta$ -R), entre otras. Estas vías se encuentran activas en procesos de transición epitelio-mesénquima (EMT) y conducen a la invasión y propagación de una variedad de carcinomas [3].

En otros cánceres, entre ellos el carcinoma de cuello uterino, se ha propuesto que podrían intervenir vías diferentes, como EGFR/PI3K/AKT/mTOR [4]. En todos los casos, la desestabilización de las uniones intercelulares es un hecho clave en la liberación de las células neoplásicas para permitir la invasión estromática.

En el caso de Wnt/Beta catenina, la beta catenina, una molécula íntimamente ligada a la Cadherina E en las uniones adherentes, se trasloca al núcleo donde actúa como un poderoso factor de transcripción, conduciendo a la célula a su transformación en tipo mesenquimático y promoviendo los mecanismos de EMT [5]. En el cáncer de cuello uterino, E6 de HPV de alto riesgo (HR-HPV) destruye la proteína MAGI, relacionada con la Cadherina E, desestabilizando la unión célula-célula [6].

El objetivo de este trabajo es a) Investigar si EMT se desarrolla en el cáncer de cuello uterino y b) Estudiar las modificaciones de la expresión de beta catenina durante el proceso de transformación neoplásica, en relación con la expresión de E6 de HR-HPV.

## Materiales y métodos

Se utilizaron piezas quirúrgicas de cuellos uterinos de archivo, con una antigüedad entre 7 y 35 años con las siguientes patologías: lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL) [12], carcinoma pavimentoso (CaP) [25], adenocarcinoma in situ (AIS) [6], adenocarcinoma (Adenok) [15]. Se practicó inmunohistoquímica con anticuerpos anti Beta Catenina (1:200), Vimentina (1:150), Alfa-Actina de Músculo liso ( $\alpha$ SMA) (1:200) [Cell Marque – Rocklin, California, USA] y E6 de HPV 16/18 (1:150) [Instituto Leloir, C.A.B.A., Argentina].

Los tacos de archivo conservan la antigenicidad de las proteínas ensayadas por muchos años, sólo dos casos en que todos los anticuerpos fallaron en la detección de las proteínas ensayadas fueron eliminados de la casuística. Además, la exposición antigénica (ver más abajo) permite desenmascarar antígenos que de otra forma se perderían.

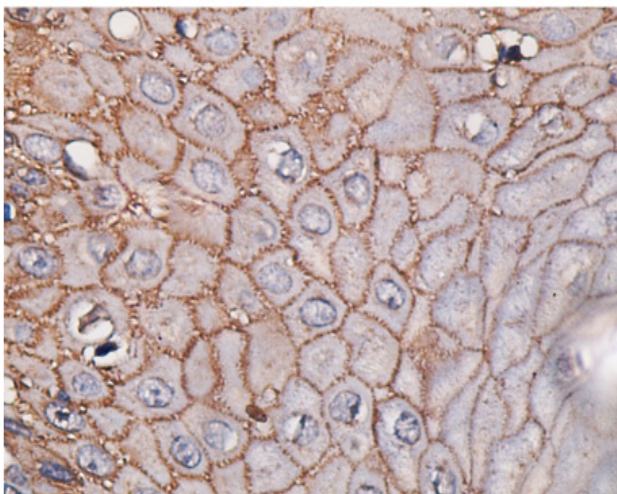
La tipificación de las muestras para HPV fue realizada con PCR y RealTime-PCR (qPCR).

## Tipificación de HPV

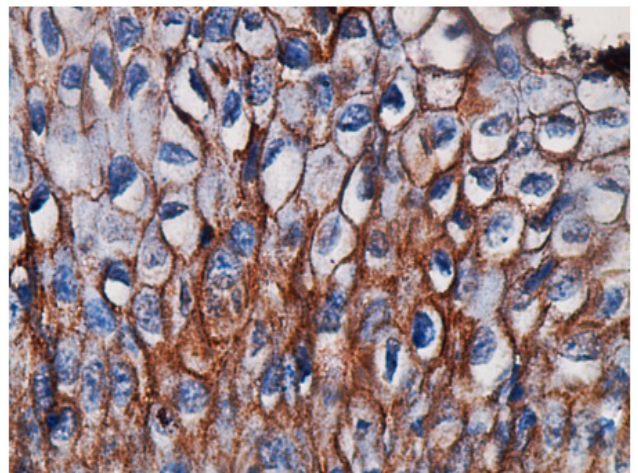
Los cortes de 7  $\mu$ m de espesor de las piezas quirúrgicas fueron desparafinados en xilol (20 minutos a 56 °C y 20 minutos a temperatura ambiente). Cinco cortes de cada pieza se utilizaron para extraer el ADN, usando el kit *ADN HP PCR Template Preparation* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Se desarrolló amplificación de ADN por qPCR utilizando Eva Green como colorante fluorescente intercalante (*KAPA HRM FAST*; Biosystems, Woburn, MA) con los siguientes primers: beta actin fw 5´-TGCGTGACATTAAGGAGAAG-3´ and beta actin rv 5´-GCTCGTAGCTCTTCTCCA-3´, que amplifican un fragmento de 99 bp de beta actina humana, como control de extracción de ADN y de PCR.

La detección de HPV-16 y 18 fue realizada utilizando un *Rotor Gene Thermocycler* (Qiagen, Hilden, Germany) con primers tipo-específicos para PCR [7].

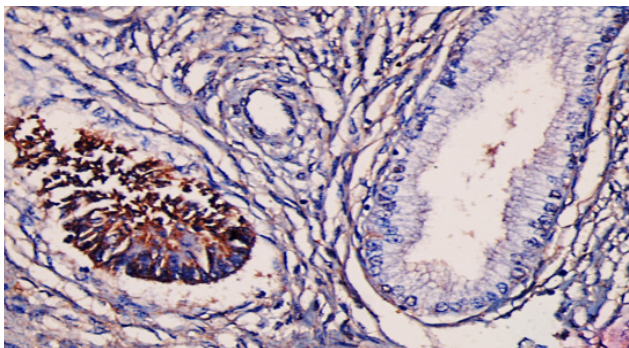
**Figura 1.** Patrón periférico de Beta catenina en EPE. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 400x.



**Figura 2.** Patrón periférico-citoplasmático de Beta catenina en EPE. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina-400x.



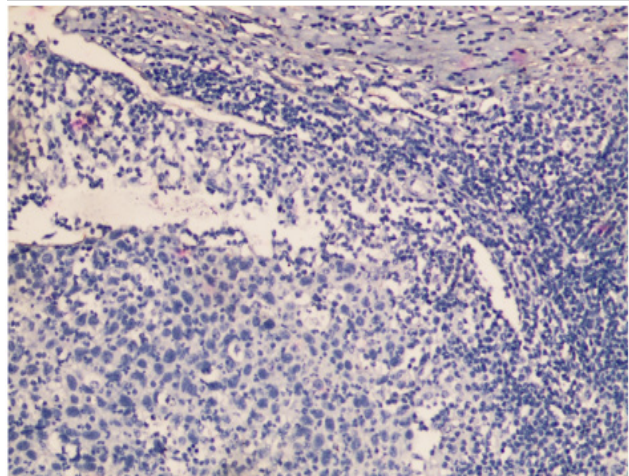
**Figura 3.** Beta catenina en AIS (izquierda) y en glándulas endocervicales normales (derecha). Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 400x.



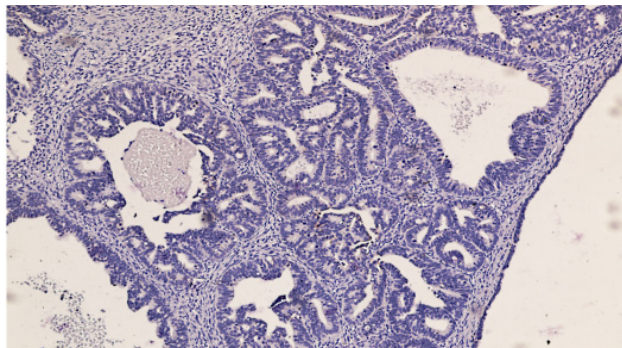
#### Inmunohistoquímica

Las piezas quirúrgicas fueron fijadas en formol al 5%, deshidratadas en alcoholes de concentración creciente, clarificadas en xilol, embebidas en parafina, cortadas con micrótopo en secciones de 2 – 4  $\mu$ m y montadas en portaobjetos tratados (Superfrost Plus-ESCO; Thermo Scientific-Erie Scientific Co., Portsmouth, NH). Después de ser desparafinizadas, fueron hidratadas con alcoholes de concentración decreciente, y sometidas a exposición antigénica en buffer citrate pH 6,0; 30 minutos a 96 – 98 °C. Luego se enfriaron en el mismo buffer por 20 minutos y se transfirieron a buffer fosfato pH 7,2 (PBS), donde se realizó el bloqueo de la peroxidase endógena y de los antígenos inespecíficos. Cada muestra fue incubada overnight con los anticuerpos correspondientes, lavada con PBS, incubada con HRP Streptavidin Label (Cytoscan™ HRP detection System; Cell Marque, Rocklin, CA) por 20 minutos, lavada con PBS, incubada con Polyvalent Biotinilated Link (Cytoscan™ HRP detection System; Cell Marque) por 20 minutos, lavada con PBS e incubada por 10 minutos con diaminobenzidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El desarrollo de una coloración parda indica la positividad de la reacción.

**Figura 5.** Desaparición de expresión de Beta catenina en CaP de cuello uterino. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 100x.



**Figura 4.** Desaparición de expresión de Beta catenina en Adenok de endocervix. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 100x.



Como controles negativos se dispuso de biopsias de tejidos pavimentosos o cilíndricos normales de secciones en parafina de cuello de útero removidos por patologías benignas.

#### Resultados

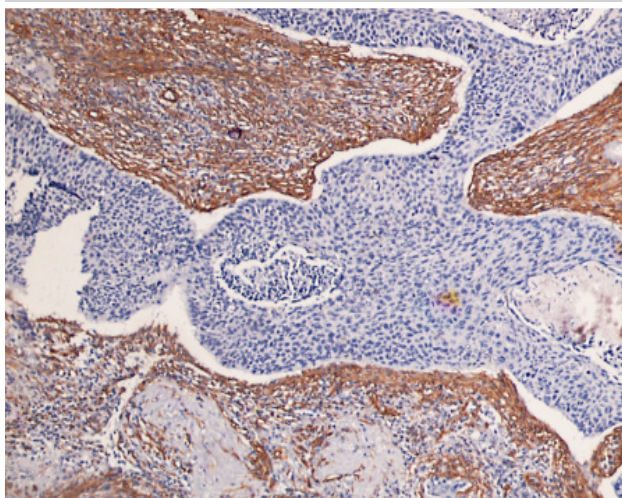
Beta catenina: presentó patrón periférico (membranoso) en EPE y en los 2/3 superiores de LSIL (12/12). Patrón citoplasmático en el 1/3 inferior de LSIL (12/12). Negativa en endocervix y positiva en células de reserva endocervicales y en AIS (6/6). Negativa en Adenok (15/15) y CaP (25/25) (Figuras 1-5).

Vimentina y  $\alpha$ SMA fueron negativas en las células epiteliales de las diversas patologías de todas las muestras estudiadas (LSIL, CaP, AIS, Adenok). El estroma de los cortes histológicos, como se esperaba, expresó ambos marcadores, aunque con mayor intensidad  $\alpha$ SMA (Figura 6).

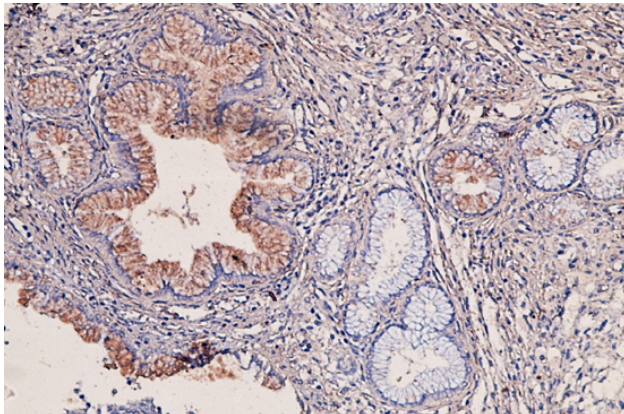
E6 de HPV 16/18 fue positiva en las células epiteliales de las diversas patologías en todas las muestras con HPV 16/18: AIS (6/6), Adenok (11/11), CaP (9/9) (Figuras 7-8).

Tipificación de HPV: en todas las muestras estudiadas fue detectado HR-HPV. En los casos portadores de HPV 16

**Figura 6.**  $\alpha$ SMA en CaP de cuello uterino. Inmunomarcación y contraste con Hematoxilina- 100x.



**Figura 7.** E6 de HPV 16/18 en Adenok de endocervix. Inmuno-marcaación y contraste con Hematoxilina- 400x.



y 18 se estudió la expresión de la proteína E6, como se describe en el párrafo anterior. [9/25] CaP, [6/6] AIS y [11/15] Adenok expresaron HPV 16/18 [Tabla 1].

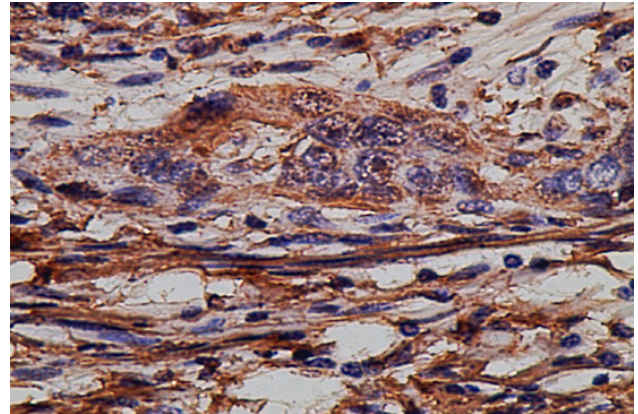
### Discusión

Durante el proceso invasivo de un carcinoma, las células neoplásicas deben perder sus uniones intercelulares para permitir que la rígida estructura que caracteriza a los epitelios se debilite, permitiendo el pasaje celular a través de la membrana basal al estroma subyacente. Entre las uniones involucradas en la unión célula-célula se destaca la unión adherente, formada por moléculas de Cadherina E, la que ambas células vecinas expresan. El dominio intracelular de esta molécula se une a beta catenina, que a su vez se relaciona con el citoesqueleto de actina. La desaparición de la Cadherina E trae como consecuencia la destrucción del complejo Cad E/Beta catenina asociado a membrana [8].

En la transición epitelio-mesénquima (EMT), demostrada en varios tipos de carcinomas, son activadas vías de señalización como Wnt/beta catenina o TGF $\beta$ -R, que activan diferentes factores de transcripción como Snail, Twist, etc., que conducen el bloqueo de la expresión de marcadores epiteliales e inducen la síntesis de moléculas de mesénquima. Las células cambian su citoesqueleto, que pierde su citoqueratina y expresa vimentina, y además expresan moléculas como  $\alpha$ SMA, que contribuye a la movilidad celular [9].

Otro cambio importante es la producción de metaloproteasas que destruyen la matriz extracelular, para facilitar el avance de las células neoplásicas a través del estroma [10]. En la ruta Wnt/beta catenina, en ausencia de factores Wnt activantes de los receptores de membrana Frizzled [ruta inhibida], la beta catenina permanece unida a Cadherina E, pero a su vez a un complejo dentro del cual la enzima GSK-3 $\beta$  se encarga de fosforilarla para que el exceso de esta molécula sea continuamente eliminado en el proteosoma. Cuando la vía de señalización Wnt/beta catenina se activa, el complejo mencionado se desestabiliza y la beta catenina, que deja de ser fosforilada, aumenta su concentración en el citoplasma hasta trasladarse al núcleo, donde uniéndose a

**Figura 8.** E6 de HPV 16/18 en CaP de cuello uterino. Inmuno-marcaación y contraste con Hematoxilina- 800x.



otra molécula se convierte en un poderoso factor de transcripción que induce los típicos cambios EMT. Al mismo tiempo, la Cadherina E va disminuyendo su síntesis para que las uniones célula-célula se debiliten, favoreciendo el proceso invasivo [11].

En este trabajo, el tipo de muestras analizadas permiten estudiar el fenómeno EMT, puesto que observamos la invasión del epitelio neoplásico al estroma subyacente.

Ninguno de los casos analizados mostró translocación nuclear de beta catenina, que es el gold estándar de la vía Wnt/beta catenina, por lo que se deduce que esta ruta no está activada en los cánceres de cuello uterino.

De todas maneras, para investigar si existe EMT aunque sea conducida por otra vía, se analizó la expresión de marcadores mesenquimáticos en los tumores: vimentina y  $\alpha$ SMA, resultando negativos en todos los casos. Por lo tanto, descartamos el fenómeno EMT en carcinomas de cuello uterino.

Queda un punto importante para analizar, y son los cambios de patrón de beta catenina desde EPE hasta el carcinoma, y la relación de la proteína E6 del HPV sobre la estabilidad de las uniones adherentes. La beta catenina mantiene un patrón periférico [membranoso] en las células del EPE, en tanto que, en las primeras manifestaciones de la transformación de este epitelio, las lesiones de bajo grado o LSIL, se observa un cambio en la distribución de esta molécula, que se expresa en el citoplasma de las células parabasales. Este hallazgo implica la desestabilización de las uniones intercelulares en las partes profundas del epitelio, lo que correlaciona con los cambios morfológicos en el tercio inferior de los epitelios pavimentosos de cuello uterino que caracterizan a los LSILs, descritos en las biopsias convencionales [12]. A diferencia del proceso EMT, la beta catenina desaparece en las lesiones avanzadas [cáncer pavimentoso y adenocarcinoma], perdiéndose totalmente la expresión citoplasmática; además, nunca es observada en núcleos.

Si no existe EMT en cáncer de cuello uterino ¿cuál será el factor desencadenante de la desestabilización de las uniones adherentes? Este interrogante podría responderse si se tiene en cuenta que los materiales estudiados estaban in-

**Tabla 1.** Marcadores en tejidos normales, pre-neoplásicos y neoplásicos de cuello uterino.

Marcadores	EPE	Endocervix	LSIL	CaP	AIS	Adenok
Vimentina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
$\alpha$ SMA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
$\beta$ Catenina	Positiva (Membranoso)	Negativa	Positiva -2/3 superiores: Membranoso -1/3 inferior: Citoplasmático	Negativa	Positiva	Negativa
E6 (HPV 16/18)	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva

fectados por HR-HPV, donde existe una expresión constante de proteínas oncogénicas virales (E5, E6, E7). E5 actúa en los primeros pasos de la carcinogénesis, interfiriendo con el recambio de los receptores al factor de Crecimiento Epidérmico, y como consecuencia aumenta el número de los mismos en las membranas de las células neoplásicas [13]. Por su parte, E6 destruye a la proteína p53, y E7 hace lo propio con pRb, eliminando el control de los principales genes supresores sobre la mitosis [14]. Pero, además, entre otras acciones, E6 de HPV 16/18 marca a hDlg (human disc large), una proteína supresora de tumores que así es degradada, con lo cual se inestabilizan las uniones de E-Cadherina; la desregulación de estas estructuras conduce a la pérdida de la adhesión de polaridad y a la proliferación descontrolada [15]. También HPV E6 degrada a homólogos de la guanilato quinasa asociada a membranas (MAGUKs): MAGI-2 and MAGI-3. La degradación de las MAGI perturba las uniones adherentes, donde se encuentran E-Cad y beta catenina [16]. El mecanismo es similar al descrito en apoptosis, donde las caspasas son las que destruyen a las MAGI, con el resultado de la separación de las células [16].

En este trabajo, utilizando anticuerpos anti-E6 de HPV 16/18, se demostró la expresión de esta proteína oncogénica en todos los carcinomas infectados por estos tipos virales, con lo cual se puede postular que la perturbación del patrón de beta catenina, liberándose al citoplasma para desaparecer en las lesiones malignas, sería una consecuencia de la actividad de E6 sobre ciertos componentes de las uniones adherentes. Si a este hecho se agrega el aumento de la expresión de EGFR descrito en carcinomas, y al alto porcentaje de cánceres de cuello uterino con mutaciones del gen PIK3CA [17], se puede plantear que la vía EGFR/PI3K/AKT/mTOR [18] sería la responsable de la progresión (invasión y metástasis) de los carcinomas de cuello uterino.

En los carcinomas de cuello uterino la proteína E6 de HR-HPV desestabiliza las uniones adherentes, siendo este proceso fundamental para desencadenar el desarrollo de los procesos invasivos. No se detecta EMT en los cánceres de cuello uterino, y la vía Wnt/beta catenina no está activada;

probablemente la vía EGFR/PI3K/AKT/mTOR completaría el proceso de malignización; este ítem requiere continuar con los estudios de los procesos de activación de esta ruta. El conocimiento de la vía de señalización activada en cáncer de cuello uterino permitiría ensayar inhibidores para algunos pasos fundamentales de la vía responsable de la invasión, con la posibilidad de convertirse, en un futuro, en drogas para el tratamiento del cáncer.

#### Referencias bibliográficas

1. Doorbar J. Molecular biology of human papilloma-virus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110:525-541.
2. Jiménez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Fernández-Tilapa G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep*. 2014;31:2467-2476.
3. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling* 2014;7:1-16.
4. Bumrungrathai S, Munjal K, Nandekar S, Cooper K, Ekalaksananan T, Pientong C, Evans MF. Epidermal growth factor receptor pathway mutation and expression profiles in cervical squamous cell carcinoma: therapeutic implications. *J Transl Med*. 2015;13:244-257.
5. van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol*. 2002;244:1-8.
6. Accardi R, Rubino R, Scalise M, Gheit T, Shahzad N, Thomas M, et al. E6 and E7 from human papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1. *J Virol*. 2011; 85:8208-8216.
7. Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefèvre P, Kaufman L, Garbar C. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:928-934.
8. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003;94:575-81.

9. Le Bras GF, Taubenslag KJ, and Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr* 2012;6:365-373.
10. Ruff M, Leyme A, Le Cann F, Bonnier D, Le Seyec J, Chesnel F, Fattet L, Rimokh R, Baffet G, Théret N. The Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 Is Associated with TGF- $\beta$ -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2015;10:e0139179.
11. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:141-149.
12. Dallenbach-Hellweg G, von Knebel Doeberitz M, Trunk MJ. Color atlas of histopathology of the cervix uteri. Editor: Gabriele Schröder. 2<sup>o</sup> Ed. Springer Heidelberg, Germany; 2006.
13. Kim S-H, Juhnn Y-S, Kang S, Park S-W, Sung M-W, Bang Y-J, Song Y-S. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/AktCell. *Mol. Life Sci*. 2006;63:930–938.
14. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2008;39:154–166.
15. Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*. 1999;18:5487–5496.
16. Kranjec C, Massimi P, Banks L. Restoration of MAGI-1 expression in HPV positive tumour cells induces cell growth arrest and apoptosis. *J Virol*. 2014;88:7155-7169.
17. Henken FE, Banerjee NS, Snijders PJ, Meijer CJ, De-Castro AJ, Rosl F, et al. PIK3CA-mediated PI3-kinase signalling is essential for HPV-induced transformation in vitro. *Mol Cancer*. 2011;10:71-77.
18. Zhang L, Wu J, Ling MT, Zhao L, Zhao KN. The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Mol Cancer*. 2015;14:87.

## REVISIÓN

# Marcadores tumorales séricos en carcinoma hepatocelular

Soria, Analía Graciela<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup>Cátedra de Patología Molecular, Instituto de Bioquímica Aplicada, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

**Contacto:** Soria, Analía Graciela; draanaliasoria@arnet.com.ar

## Resumen

El cáncer de hígado es uno de los tumores malignos más frecuentes en el mundo y su incidencia varía considerablemente según las regiones geográficas estudiadas, debido a los factores etiológicos involucrados. El virus de las hepatitis B y C y el estado cirrótico de los pacientes son los responsables de la gran mayoría del cáncer de hígado. El conocimiento de los mecanismos moleculares y el reconocimiento de que la acumulación gradual de defectos genéticos durante el desarrollo tumoral puede contribuir con la forma de prevenir, diagnosticar y tratar el cáncer conlleva a intensificar el estudio de estos. En este trabajo se realiza una revisión de la literatura acerca de los marcadores tumorales como la alfafetoproteína y otros marcadores tumorales como la fracción de alfafetoproteína que se une a la lectina (L3-AFP) y Desgamma carboxiprotrombina. Dado que en el Hepatocarcinoma están involucrados distintos agentes etiológicos se deben investigar combinaciones de marcadores tumorales que pueden proveer información más exacta para el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes.

**Palabras clave:** carcinoma hepatocelular, biomarcadores, alfafetoproteína, diagnóstico, pronóstico.

## Abstract

Liver cancer is one of the most common and deadly malignant neoplasms worldwide. There are differences and variations with the incidence of Hepatocellular Carcinoma worldwide. Important risk factors for Hepatocellular Carcinoma development include liver cirrhosis, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection, excessive alcohol consumption, ingestion of aflatoxin B1, and nonalcoholic steatohepatitis. Advances in genetics and molecular biology have improved our knowledge of accumulation of genetic defects during tumor development. Therefore, early detection and adequate therapy are crucial to increase survival and improve the life quality of Hepatocellular Carcinoma patients. In this review, an overview of the potential of serum-associated Hepatocellular Carcinoma biomarkers for diagnosis and prognosis is presented. To this end, we reviewed the literature on tumor markers such as alpha-fetoprotein and the alpha-fetoprotein fraction that binds to lectin [L3-AFP] and Carboxyprothrombin Degamma. New markers were investigated for their diagnostic accuracy and potential for Hepatocellular Carcinoma detection. However, the clinical usefulness of these biomarkers, applied either individually or combined, in the early detection of Hepatocellular Carcinoma, as well as their usefulness in therapeutic decision-making and prognosis need to be carefully evaluated and validated.

**Key words:** hepatocellular carcinoma, biomarkers, alpha-fetoprotein, diagnostic, prognosis.

## Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. El cáncer de hígado puede originarse a expensas de las células hepáticas, que son el componente del parénquima hepático y que representan el 60 % del volumen total del órgano, o en los conductillos biliares intrahepáticos. Se denomina hepatocarcinoma (HC) en el primer caso y colangiocarcinoma (CC) en el segundo. En ocasiones pueden ser hepatocolangiocarcinomas. Los carcinomas primarios son de menor frecuencia que los carcinomas secundarios o metastásicos y difieren obviamente desde el punto de vista histológico, pues los últimos tienen la identidad y la estructura del órgano del que proceden.

El HC es más frecuente (90 %) que el CC. El HC del adulto se ha descrito asociado a la cirrosis en la mitad de los casos de autopsias. Tiene por característica el invadir las gruesas venas, formando trombos tumorales. La trombosis neoplásica de las venas suprahepáticas condiciona la ascitis hemorrágica y el síndrome de Budd-Chiari [1]. El diagnóstico generalmente se realiza cuando el tumor adquiere bastante tamaño. El examen clínico, la ecografía, la tomografía axial computarizada y/o la resonancia magnética, son elementos de diagnóstico útiles en el cáncer de hígado. La laparoscopia con biopsia hace el diagnóstico preciso. El HC es potencialmente curable con resección quirúrgica, pero es sólo posible para una fracción muy pequeña de pacientes, con enfermedad localizada. El HC se debe distinguir del CC, así como también del cáncer metastásico que se origina en otros órganos (mamas, pulmones, ovarios, riñón, etc.) y se disemina por el sistema porta del hígado. La metástasis puede ser advertida precozmente, simultánea al tumor primario o tardíamente, a veces hasta 10 a 15 años después de la resección del tumor primario. El cáncer secundario se manifiesta clínicamente por hepatomegalia, nodulaciones, síndrome febril prolongado. Puede haber colestasis por compresión o por infiltración de vías biliares principales. En cualquier momento la evolución se acelera por trombosis portal o suprahepática, con gran hepatomegalia, ascitis, ictericia, derrame pleural, fiebre, coma y muerte [2].

El HC es el quinto cáncer más común en el mundo en el hombre y el noveno en la mujer, pero como es de mal pronóstico es la segunda causa de muerte en ambos sexos [3], la relación hombre - mujer es aproximadamente 4:1.

Uno de los factores de riesgo para desarrollar un HC es la cirrosis hepática por lo que esta lesión constituye el factor de riesgo fundamental independientemente de su etiología. Un 20 % de los pacientes cirróticos desarrollan un HC a los 5 años de seguimiento. Los nódulos de regeneración per se, pueden considerarse lesiones pre-neoplásicas. Las infecciones por el Virus de la Hepatitis B (VHB), y el de la Hepatitis C (VHC), incrementan el riesgo de HC 20 veces. Como el VHB es más prevalente, la distribución de la infección en el mundo explica la distribución del HC. La excepción es Japón donde la infección crónica por VHB es baja, pero el HC está relacionado a la infección por el VHC. Más del 75 % de los casos de HC

en el mundo y el 85 % de los HC en países en desarrollo son causados por estos virus. La exposición a aflatoxinas es probablemente un importante factor de riesgo para HC en áreas tropicales del mundo donde la contaminación de granos con el hongo *Aspergillus fumigatus* es común. Un efecto multiplicador entre exposición a aflatoxinas e infección crónica por VHB sugerirían diferentes mecanismos carcinógenos [4]. La ingesta de alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) fueron asociadas al riesgo de tener HC [5].

El objetivo de la presente revisión bibliográfica fue determinar el estado del conocimiento actual acerca de los principales marcadores tumorales con aplicación clínica en HC, en base a las publicaciones científicas aparecidas en revistas indexadas.

## Materiales y métodos

Se utilizaron distintas bases de datos en línea: PubMed, MedicLatina, SciELO. Los términos de búsqueda fueron "Hepatocarcinoma", "Biomarcadores", "Alfafetoproteína", "L3-AFP", "Desgamma carboxiprotrombina" combinados con "Diagnóstico", "Pronóstico", y "Vigilancia". Para cumplir el objetivo se inició esta revisión con una breve definición de marcadores tumorales y, una extensa revisión de la alfafetoproteína: estructura y función, aplicación clínica, otros marcadores tumorales que son investigados, pero que tienen menor aplicación clínica en la práctica como la fracción L3 de la AFP y las proteínas inducidas por la ausencia de vitamina K o antagonistas II (PIVKA) o su otra denominación Desgamma carboxiprotrombina (DCP).

## Marcadores tumorales

### Definición

Conjunto de moléculas de características divergentes pero que comparten su asociación con las neoplasias, lo que facilita su aplicación en la detección clínica (diagnóstico y screening) y en el manejo (pronóstico y monitoreo) de los pacientes con cáncer. Son proteínas, glicoproteínas, gangliósidos (con o sin actividad biológica definida), enzimas, hormonas, metabolitos producidas por el tumor o el órgano del huésped que señala la presencia o desarrollo de un tumor maligno [6].

### Alfafetoproteína

#### Estructura y función

La alfa-fetoproteína (AFP) fue descubierta en 1963 por Abelev en el HC. Se trata de una glicoproteína con una vida media plasmática de 5 a 7 días, sintetizada en el saco vitelino, en el hígado fetal y tracto gastrointestinal, a partir de la décima semana de gestación. Es el componente más importante del plasma fetal, alcanzando picos de concentración de 3 mg/mL a las 12 semanas de gestación. Tras el nacimiento disminuye progresivamente hasta alcanzar concentraciones muy bajas en el segundo mes de vida, y se mantiene así en la vida adulta, durante la que se consideran normales valores inferiores a 10 mg/mL [7,8].

La AFP es un miembro de la familia del gen albuminoide el cual tiene cuatro miembros: albúmina, proteína de unión a la vitamina D, AFP, y alfa albúmina. Todos los miembros son capaces de funcionar como transportador de ligandos, pero además tienen otras funciones, como quimiotaxis, actividad esterasa, adherencia leucocitaria, peroxidación lipídica estimulada por cobre, unión a ácidos grasos, metales pesados, actinas entre otros. Altas concentraciones de algunos ligandos hidrofóbicos podrían inducir cambios en la estructura terciaria de la AFP [9].

Aunque la AFP podría no ser la causa directa de la alteración del crecimiento observada en defectos congénitos y en pacientes con cáncer, es posible que algunas variantes conformacionales sean inducidas por stress/shock y de esta manera podrían contribuir con tales eventos. Algunos trabajos comunican que las formas de AFP podrían servir como un regulador de crecimiento capaz de aumentarlo o inhibirlo [10]. Las formas de AFP humana del adulto podrían derivar de múltiples transcritos de ARN (por ejemplo, de 2,2; 1,7; 1,6 kb) pero la forma humana detectada en los ensayos es la de un polipéptido de 69000 a 70000 kD (2,2 kb). Es probable que las otras formas de transcritos de mRNA se encuentren en tejido y suero, pero no sean detectables por los ensayos inmunológicos disponibles en la práctica clínica.

Se describieron cuatro receptores de la superficie celular que podrían unir varias formas de AFP de componente epitelial y endotelial. En el endotelio vascular y algunos tejidos como corazón, pulmón, epidídimo, los receptores son de 18, 31 y 60 kD. Los receptores de 18 y 31 kD depuran albúminas y AFP desnaturalizadas o modificadas químicamente mientras que la forma de 60 kD es una sialoglicoproteína de la superficie de la célula endotelial que se encuentra en endotelios continuos (no sinusoidal) [11].

La AFP tiene tres dominios: en el dominio I se pueden identificar distintos segmentos, uno similar a la cadena alfa de la insulina (ILS) que estaría involucrado en la captación de glucosa por los eritrocitos humanos. EGFL corresponde a un segmento similar al factor de crecimiento epidermal. HMS-1, HMS-2 corresponderían a sitios de unión de metales pesados. NAI son sitios identificados como no albúmina. PRS corresponde a secuencias ricas en prolina. BBS-1, BBS-2 son sitios de unión a la bilirrubina. LRE, LDV, RGD corresponde a secuencias de adhesión celular. FBS es el sitio de unión a ácidos grasos. ZBS es el sitio propuesto de unión al Zn. En el Dominio II: SRGD es el sitio inverso al RGD. L-B1 segmento laminina B. KLS segmento similar a la kinesina. L-A segmento laminina A. ABS sitio propuesto para la unión a actina. Dominio III: MPS corresponde al segmento de la caseína de la leche. EBS sitio de unión a estrógeno. GIP corresponde al péptido inhibidor del crecimiento. RBS es el sitio propuesto para la unión al receptor de AFP. HCS segmento de histocompatibilidad clase II, la secuencia de aminoácido del 542 a 550 del dominio III se une con baja afinidad a células T dendríticas CD8 marcadas con HLA-A2.1 y muestra una cinética de disociación lenta. PAS segmento

activador del plasminógeno. ARP péptido relacionado a la apoptosis. El dominio II (aminoácidos 190-394) de la AFP tiene una secuencia peptídica corta, común a las proteínas de la matriz extracelular (MEC) conocidas como moléculas de adhesión celular. Este dominio diferencia la AFP del resto de los miembros de esta familia que no incluyen esta secuencia peptídica corta, similar a la familia de las proteínas de la MEC (laminina, fibronectina, colágeno, vitronectina, etc.). Estas macromoléculas tienen una utilidad potencial en el desarrollo de las enfermedades, pudiendo estar involucrada en el crecimiento, diferenciación, migración celular y metástasis tumoral. La AFP comparte con una amplia variedad de moléculas de adhesión secuencias similares, sugiriendo que la AFP podría compartir propiedades funcionales con estas moléculas. Esta proteína fetal tendría actividades regulatorias del crecimiento ya que en su estructura primaria tiene un conjunto de sitios peptídicos de adhesión [12]. La AFP ontogénicamente precede a la albúmina en la síntesis y formación y tendría importancia en el crecimiento y diferenciación celular [13]. Diferentes isoformas podrían ser demostradas por técnicas electroforesis, cromatografía o isoeléctricas en combinación con métodos que emplean lectina. Las cadenas de azúcares no son codificadas genéticamente, dependen del set de enzimas de glicosilación presentes en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi de las células del huésped. Estas enzimas tienen diferentes distribuciones en los distintos tejidos y las variantes de la AFP se deben a las vías enzimáticas involucradas. Consecuentemente la AFP del saco vitelino, difiere de la AFP de origen hepático. La AFP del líquido amniótico es una mezcla de estos dos tipos en diferentes relaciones dependiendo de la edad gestacional [8]. Las disimilitudes encontradas en los distintos tipos tumorales sugieren diferencias cuantitativa y cualitativa en la glicosidación enzimática.

La heterogeneidad de los carbohidratos de la AFP ha incentivado el uso de técnicas de separación por afinidad a lectinas para el diagnóstico de defectos del feto y para diferenciar entre diferentes tipos de tumores. En 1979 se demostró que las isoformas de la AFP del fluido amniótico contienen una mezcla de las variantes que se unen a la Con-A (origen saco vitelino) y de las que no se unen a Con-A (origen hepático). La variante que no une Con-A se encuentra disminuida en embarazos con fetos con defectos del tubo neural, y puede ser separada y cuantificada por cromatografía en columna [14]. En 1981 queda claro que la heterogeneidad de los azúcares unidos a la AFP podría ser considerada como una herramienta útil en el diagnóstico diferencial del cáncer. Los tumores de saco vitelino y los cánceres gastrointestinal pueden ser diferenciados de los hepatomas basándose en la reactividad con la aglutinina *Lens culinaris* (LCA) y de las patologías hepáticas benignas las cuales no son reactivas con LCA [15].

La AFP es un antígeno con múltiples sitios de determinantes antigénicos, los cuales sirven para inducir la formación de anticuerpos. La AFP posee al menos seis epitopes

**Tabla I.** Valores de Referencias de Alfetoproteína según edad y género.

Edad	Masculino (ng/ml)	Femenino no embarazada (ng/ml)
0-1 mes	0,6-16387	0,6-18964
1-12 meses	0,6-28,3	0,6-77,0
1-3 años	0,6-7,9	0,6-11,1
4-6 años	0,6-5,6	0,6-4,2
7-12 años	0,6-3,7	0,6-5,6
13-18 años	0,6-3,9	0,6-4,2

mayores y posiblemente 12 epitopes menores con un total de 18 sitios antigénicos.

Los estudios realizados han demostrado que la conformación de la AFP es modificada por cambios en el microambiente como por ejemplo aumento de las concentraciones de ligandos hidrofóbicos tales como estrógeno esteroidal y ácidos grasos [16]. Los desórdenes congénitos involucran concentraciones alteradas de AFP que podrían estar asociadas con una proteína defectuosa en el ensamblaje o en el plegamiento o con variantes conformacionales.

El síndrome de Down se caracteriza por niveles bajos de AFP en el fluido amniótico y la sangre materna, lo cual podría ser indicativo de síntesis hepática baja de AFP o alteraciones conformacionales de la proteína secretada que elude la detección serológica. Los datos analizados de embarazos con fetos con síndrome de Down sugerirían que alteraciones conformacionales de AFP resultarían de un procesamiento defectuoso por el riñón fetal y del pasaje alterado a través de la membrana o de la placenta a la circulación materna [17].

La AFP podría regular el crecimiento celular por aumento o inhibición de la apoptosis en cultivo de células tumorales, mientras que en los casos de inhibición de crecimiento inducido por AFP involucraría señales de transducción, los eventos podrían ser relacionados a efectos más citostáticos que citotóxicos [18]. Con respecto a la apoptosis ha sido publicado que células de hepatomas de una línea de cultivo celular HepG2 sin AFP que pudiera unirse a la superficie celular, es susceptible a la citotoxicidad inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF). Estas células en presencia de AFP son resistentes a la citotoxicidad por TNF [19]. Estudios posteriores han comunicado que la AFP podría inducir apoptosis en varias líneas de cultivo celular (hepatomas y linfoblastomas) en unas pocas horas y ocurre con dosis fisiológicas de AFP, pero no a bajas dosis [20]. La apoptosis inducida por AFP sucede en forma independiente del receptor TNF. En células tumorales Raji la apoptosis ocurre

por activación de caspasa 3 sin comprometer la vía FAS y señales dependientes del receptor TNF. El efecto citotóxico de AFP está relacionado a apoptosis y es independiente de la regulación negativa de Bcl-2, Bcl-L y de la cascada de señales dependientes del receptor TNF [21]. La AFP en dosis alta in vitro muestra inhibición del crecimiento sobre una variedad de líneas de células tumorales, pero no en bajas dosis. Llamativamente todas las dosis de AFP estimulan el crecimiento de fibroblastos epidermal del embrión. Estos datos demuestran que la AFP podría inducir actividad de crecimiento estimulador o inhibitorio, dependiendo de la concentración relativa de AFP y de las citoquinas endógenas o exógenas, de las hormonas, y de los factores de crecimiento en el medio de cultivo. Otro mecanismo que la AFP podría emplear para regular el crecimiento involucraría la interacción proteína a proteína en el curso de las señales de cascadas citoplasmáticas. Como la AFP no se localiza en el compartimento nuclear de las células, es poco probable que pueda afectar el proceso de transcripción nuclear. La AFP se localiza en la matriz extracelular, en la superficie celular, en las endosomas, en el receptor de estrógeno y en el espacio perinuclear [22].

#### Aplicación clínica de la AFP

La AFP puede encontrarse elevada en HC y en otras enfermedades tumorales (hepatoblastomas, tumores de células germinales y algunos tumores gastrointestinales), en enfermedades hepáticas benignas y en procesos de regeneración hepática (hepatitis virales o hepatitis inducidas por drogas y cirrosis). Se encuentra elevada en ataxia-telangiectasia y en tirosinosis hereditaria [23-25]. Es raro encontrar niveles elevados de AFP en personas sanas. A pesar de esto, se trata del marcador tumoral de mayor utilidad para el diagnóstico, el control de la evolución clínica, el diagnóstico temprano de las recidivas y la monitorización del tratamiento del HC. Soresi y col. analizan la utilidad de la AFP en el diagnóstico del HC y tratan de establecer el mejor valor de corte que permita diferenciar la cirrosis hepática (Ci H). La etiología de Ci H y HC fue VHC, VHB, VHB/VHC, y no virales. El mejor valor que discrimina estas patologías fue de 30 ng/mL. Con este valor la sensibilidad (S) fue del 65 % y la especificidad (E) 79 %. Utilizando este valor de corte y dividiendo los pacientes según la etiología viral o no viral el valor predictivo positivo (VPP) fue del 70 % vs. 94 %, respectivamente. En enfermedades no virales el VPP fue del 100 % para niveles de AFP de 100 ng/mL, mientras que para etiologías virales fue del 100 % cuando la AFP es mayor de 400 ng/mL. Los autores consideran que el mejor valor de corte para AFP sérica fue de 30 ng/mL pero con este valor la S es baja, detectándose con mayor S HC de etiología no viral, confirmando que la utilidad de AFP para CH de etiología viral es limitada [26]. Estos resultados son coincidentes con otros autores [27,28]. Ahn y col sugieren que para pacientes con HC en Korea el valor de corte de 100 ng/mL tiene mayor S

con similar E y VPP que 200 ng/mL [29]. Los pacientes con hepatitis crónica C sin HC tienen valores de AFP elevada en el 23 % si se considera un valor de corte de 10 ng/mL [30]. En pacientes con cirrosis cuya etiología fue VHC se sugiere un valor de corte de 200 ng/mL con lo que la E para HC fue del 100 % [31]. En pacientes con hepatitis crónica por el VHB o VHC tienen falsas elevaciones de AFP (mayores a 100 ng/mL) y si a pesar de los tratamientos antivirales la elevación persiste más de 12 meses podría ser un marcador importante del desarrollo del HC. El valor de corte utilizado es de suma importancia y dependerá fundamentalmente de la incidencia del HC y la etiología de este. Así, en pacientes con lesiones unifocales de HC que reciben hepatectomía, los valores de AFP superiores a 200 ng/mL fue asociado con la expresión de mARN y correlaciona con los factores clínico-patológicos más importantes. En pacientes jóvenes (menor o igual a 55 años) el HBsAg, la mutación de p53, el tamaño tumoral, la invasión vascular, y la recurrencia temprana fueron significativamente asociada con niveles elevados de AFP, mientras que anti-VHC y mutación de beta-catenina en HC tiene menos frecuentemente elevados los niveles de AFP. También se demostró que los pacientes que tienen elevados los niveles de AFP sérica tienen menos de 10 años de supervivencia fundamentalmente en tumores de mayor tamaño tumoral. En este trabajo, comunican como factores pronósticos desfavorables los niveles elevados de AFP, positividad del HBsAg, mutación del p53, cirrosis hepática, tumores grandes, invasión vascular y recurrencia temprana. Los autores concluyen que el aumento de AFP sérica más que un epifenómeno en coincidencia con el HC contribuiría en la invasión vascular y la progresión del HC y, ayudaría a identificar subpoblaciones de pacientes con HC con riesgo aumentado de recurrir en forma temprana y con pobre pronóstico después de la hepatectomía [32]. Esta correlación con el tamaño es lo que hace que la determinación de los valores serológicos de AFP no sea un método de tamizaje eficaz del HC en la población general, puesto que su sensibilidad oscila entre el 50 % y el 70 %. Solo es útil para el diagnóstico temprano en zonas endémicas aplicado a grupos seleccionados y en la evaluación de masas hepáticas en pacientes con riesgo particular de desarrollar un HC. En estos grupos de riesgo, su sensibilidad es superior al 70 % y su especificidad alcanza el 100 %, y como se mencionó, anteriormente, la sensibilidad es mayor en el diagnóstico temprano cuando el HC tiene un origen no viral. En pacientes seropositivos para AFP se demostró que los niveles se asocian con tamaños tumorales mayores, invasión vascular y tumores pobremente diferenciados. Sin embargo, los médicos deben ser conscientes de que ni un resultado positivo o negativo de la AFP sérica sería conclusivo para el diagnóstico final de HC [33]. Los valores pretratamiento de AFP también tienen un valor pronóstico para los pacientes con CH. Así, los rangos de supervivencia en pacientes con valores normales de AFP y moderadamente elevados (21,8 - 327 ng/mL) son significativamente superiores que en pacientes con valores

marcadamente elevados (> 436 µg/l). Hsu y col. demuestran que la AFP tiene capacidad predictiva independiente en pacientes con HC. Los niveles de AFP de 20 y 400 ng/mL se consideran puntos de corte factibles para predecir la supervivencia de pacientes con HC en Taiwan [34]. En pacientes con HC con resección hepática, la determinación de AFP se considera un indicador del grado de resección del tumor. Así, una disminución de los valores de AFP menor de la esperada o valores estables, después de una semana de la resección, se asocian a resecciones incompletas y a un peor pronóstico. El cambio en los niveles de AFP 2 a 4 semanas después de iniciar la quimioterapia basada en oxaliplatino es útil para predecir la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes [35]. En el seguimiento, la AFP es útil para el diagnóstico temprano de las recidivas tumorales, de forma que, ante un paciente con historia de tumor productor de AFP, su elevación es suficiente para establecer el diagnóstico de recidiva. Los valores elevados de AFP también tienen una implicación en la terapéutica, puesto que se ha propuesto como uno de los criterios (junto con el CH invasivo nodular, la invasión vascular, las metástasis intrahepáticas y las rupturas capsulares) que aconsejan el tratamiento adyuvante o el trasplante hepático, debido al alto riesgo de recurrencia que presentan los pacientes con 3 o más de estos criterios. Es importante remarcar que ni las guías americanas ni las europeas para el cribado, el diagnóstico y vigilancia de HC incluyeron la cuantificación de la AFP sérica debido a la escasa sensibilidad y especificidad del método [36,37]. Se ha demostrado que el 80 % de los HC pequeños no cursan con elevación de los niveles de AFP [38]. La aplicación clínica de este marcador es como predictor de recurrencia tumoral antes del tratamiento y para monitorear el tratamiento [39]. Las técnicas comerciales disponibles para su determinación en el laboratorio clínico son ELISA, RIA, quimioluminiscencia [40,41]. Los valores de referencia se muestran en la Tabla I. Para adultos no gestantes: hasta 10 ng/ml (Factor: ng/ml = U/ml x 1,21).

## Otros marcadores tumorales

### L3-AFP

Se identificaron tres glicofomas diferentes de AFP que tienen distintas afinidades de unión a *Lens culinaris agglutinin* (LCA). Las fracciones L1-AFP y L2-AFP no se une o se une débilmente a la lectina respectivamente, la L3-AFP se une a LCA 19 y es considerado como un biomarcador más del HC. Sterling y col [42] realizaron un estudio prospectivo multicéntrico en donde demuestran que el diagnóstico de HC basado en la L3-AFP podría alcanzar una especificidad de casi el 92 %, aunque con una sensibilidad baja del 37 %. Otro inconveniente para AFP-L3 es que muestra poco valor diagnóstico en HC con una concentración sérica total de AFP por debajo de 20 ng/mL. En este sentido, el inmunoensayo automatizado por electroforesis altamente sensible L3-AFP utilizado por Oda y col mejora los resultados, demostrando

que este marcador es útil para la detección temprana de HC en pacientes con enfermedades benignas del hígado, incluso para aquellos con AFP sérica menores a 20 ng/mL. Además, con esta técnica la L3-AFP aumenta antes de que el HC sea detectable por diagnóstico por imágenes, por lo que el ensayo puede ayudar a identificar pacientes con enfermedades benignas con un riesgo más alto de CH [43,44]. Pacientes con valores de AFP totales entre 10 - 200 ng/mL pueden beneficiarse con la determinación de L3-AFP ya que valores mayores a 35 % tienen un 100 % de especificidad para HC. Utilizado en combinación con AFP, puede ser un marcador clínicamente útil para el diagnóstico de HC [45]. Los pacientes con valores elevados de L3-AFP tienen peor función hepática, tumores de mayor tamaño, y tumores más avanzados y con histologías de peor pronóstico que aquellos con valores negativos, y con mayor frecuencia presentan metástasis a distancia [46]. Las técnicas comerciales estandarizadas no están disponibles en la Argentina y países como Japón ensayan inmunoensayos automatizados [47,48].

#### **Proteínas inducidas por la ausencia de vitamina K o antagonistas II (PIVKA) o Desgamma carboxiprotrombina (DCP)**

Es una protrombina anormal que carece de residuos -carboxi y por lo tanto no puede convertirse en una enzima de coagulación activa. Es un marcador de baja especificidad, particularmente en la enfermedad colestásica, que produce una disminución de la vitamina K. En un estudio que incluye 120 pacientes con HC y 90 pacientes con cirrosis, se encuentra que la concentración media de DCP en pacientes con HC fue mayor que en pacientes con cirrosis. El 53,3 % y el 14,4 % de los pacientes con HC y cirrosis tienen niveles superiores a 40 mAU/mL, respectivamente. No se encontró correlación entre los niveles séricos de AFP y DCP. La combinación de estos marcadores tumorales podría incrementar la sensibilidad de la AFP sola para el diagnóstico de HC [49,50]. La expresión de DCP y AFP en forma simultánea en 168 pacientes con HC permite la clasificación de estos pacientes en cuatro grupos: un grupo seronegativo para ambos marcadores (AFP < 20 ng/mL y DCP < 40 mAU/mL). Un grupo seropositivo para AFP > 100 ng/mL y seronegativo para DCP. Un grupo seronegativo para AFP y seropositivo para DCP (> 100 mAU/mL). El último grupo corresponde a la seropositividad para AFP y DCP. Los autores no encuentran diferencias entre los grupos con respecto a la edad, marcadores virales, y la presencia de cirrosis. El grupo DCP+ y el grupo AFP/DCP+ ocurre en pacientes con más frecuencia de sexo masculino, y tienen mayor incidencia de HC de 3 cm o más comparado con el grupo AFP/DCP- y AFP-. Los pacientes del grupo AFP/DCP+ muestran mayor incidencia de HC no solitarios, con tumores mayores de 3 cm y la presencia de trombosis portal cuando se compara con los otros tres grupos, y también muestran menor sobrevida [51]. En un estudio reciente, se analizan los niveles de ambos marcadores en 90 pacientes cirróticos con nódulos hepáticos, de los cuales en 40 se confirma HC. Para un valor de corte de

60 mAU/mL para DCP se encontró una asociación con HC en análisis univariado y multivariado, no encontrándose asociación para AFP para un valor de corte de 6,5 ng/mL. Para DCP: la S fue de 60 %, E 88 %, VPP 80 % y VPN 73 %. Para AFP: la S fue de 67 %, E 68 %, VPP 63 % y VPN 72 %. Cuando se combinan ambos marcadores: la S fue de 70 %, E 94 %, VPP 91 % y VPN 79 %. Los autores concluyen que la DCP es útil para el diagnóstico de pacientes cirróticos con nódulos hepáticos y tienen alta exactitud diagnóstica cuando se lo realiza junto a la AFP [52]. Resultados similares fueron documentados en pacientes con HC cuya etiología fue mayormente por VHB en una población de China [53]. Niveles más altos de DCP se asociaron con mala evolución clínica y menor sobrevida en pacientes con HC. El DCP es un marcador complementario a la AFP identificando pacientes con HC que no secretan AFP y excluye pacientes con niveles elevados de AFP que no tienen HC (cirrosis hepática). Los autores demuestran un mejor desempeño en la vigilancia del HC, en el diagnóstico precoz, en la respuesta al tratamiento y el monitoreo de la recurrencia en la población con HC relacionada con el VHB [54,55]. Una revisión sistemática para definir la utilidad de DCP en HC que incluyó 38 estudios con 5298 pacientes con CH y 5826 controles consideran que tiene una aplicación diagnóstica moderada, pero debido a la heterogeneidad de los estudios las conclusiones deben ser confirmadas con estudios de mayor calidad [56]. No se cuenta con técnicas comerciales disponibles para la determinación de DCP y su uso es solo hasta el momento con fines de investigación con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la AFP para el diagnóstico de HC [57,58].

#### **Discusión**

La correlación de los niveles de AFP con el tamaño tumoral del hepatocarcinoma es la causa por lo que no es un método de tamizaje eficaz en la población general.

La determinación de AFP es útil para el diagnóstico temprano de hepatocarcinoma en zonas endémicas aplicado a grupos seleccionados y en la evaluación de masas hepáticas de pacientes con riesgo particular de desarrollar un HC.

En los pacientes con HC sin tratamiento o a quienes se les realizó resección hepática los valores elevados de AFP indicarían un pronóstico desfavorable.

Tras la resección hepática, la determinación de AFP se considera un indicador del grado de resección. Una disminución de AFP menor de la esperada o valores estables después de 1 semana de la resección se asocian a peor pronóstico.

En el seguimiento de los pacientes, la AFP es útil para el diagnóstico temprano de las recidivas tumorales, su aumento es suficiente para establecer el diagnóstico de recidiva. Las limitaciones de la aplicación clínica de la AFP en pacientes con HC potencia la necesidad de identificar biomarcadores que usados solos o en forma complementaria a la AFP permita diagnosticar HC en estadios tempranos.

Pacientes con valores de AFP totales entre 10 - 200 ng/

mL pueden beneficiarse con la determinación de L3-AFP. Los pacientes con valores elevados de L3-AFP tienen peor pronóstico que aquellos con valores negativos, y con mayor frecuencia presentan metástasis a distancia. La falta de disponibilidad de equipos comerciales estandarizados es un inconveniente para su aplicación en la práctica clínica.

El DCP es un marcador complementario a la AFP con un mejor desempeño en la vigilancia del HC, en la respuesta al tratamiento y el monitoreo de la recurrencia en la población con HC; sin embargo, tiene una aplicación diagnóstica moderada. Tampoco se dispone de equipos comerciales para su determinación, por lo que no se lo realiza de rutina, siendo todavía en nuestro país un marcador que se lo realiza sólo para investigación.

A diferencia de otros tipos de cáncer, el área geográfica, las variaciones en la biología impiden que podamos basarnos en una guía universalmente aceptada para todos los pacientes con HC alrededor del mundo. Las recomendaciones están influenciadas por estas variables (es decir, áreas de mayor hepatitis por distintas etiologías virales, u otras causas) y por los recursos disponibles. Es importante incluir estas variables al tratar pacientes con HC y también cuando se estructuran políticas y lineamientos de prevención.

#### Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló en el marco del Proyecto "Relación entre consumo crónico de agua contaminada con arsénico y alteraciones inducidas por arsénico. Investigación de factores de riesgo asociados a la presencia de enfermedad. Concordancia entre lesiones orales e hidroarsenicismo crónico". PIUNT 26/D536 financiado por la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional de Tucumán.

#### Referencias bibliográficas

- Martel C, Maucourt-Boulch D, Plummer M, Franceschi S. World-wide Relative Contribution of Hepatitis B and C Viruses in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2015; 62:1190-1200.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013;58:593-608.
- Siegel RL, Mille KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67:7-30.
- Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014; 63:844-855.
- Luo RH, Zhao ZX, Zhou XY, Gao ZL, Yao JL. Risk factors for primary liver carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2005;11:4431-4434.
- Holdenrieder S, Pagliaro L, Morgenstern D, Dayyani F. Clinically Meaningful Use of Blood Tumor Markers in Oncology. *BioMed Research International* 2016;1:1-10.
- Perheentupa A, Ruokonen A, Tuomivaara L, Ryyanen M, Martikainen H. Maternal serum beta-HCG and alpha-fetoprotein concentrations in singleton pregnancies following assisted reproduction. *Hum Reprod* 2002;17: 794-797.
- Mizejewski GJ. Levels of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstet Gynecol Surv* 2003;58:804-826.
- Maldonado Mercado MG, Pereyra Morales MA, Zenteno Galindo EA. Estructura y función de la alfa-fetoproteína. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 2015;58:1-9.
- Cillo U, Vitale A, Navaglia F, Basso D, Montin U, Bassanello M, et al. Role of blood AFP mRNA and tumor grade in the preoperative prognostic evaluation of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:6920-6925.
- Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein Structure and Function: Relevance to Isoforms, Epitopes, and Conformational Variants. *Exp Biol Med* 2001;226:377-408.
- Morozov AV, Timofeev AV, Morozov VA, Karpov VL. Critical amino acids of ornitin decarboxylase degranon: the presence and C-terminal arrangement is insufficient for alfa-fetoprotein degradation. *Mol Biol [Mosk]* 2011;45:529-537.
- Baker ME. Evolution of alpha-fetoprotein: sequence comparisons among AFP species and with albumin species. *Tumour Biol* 1988;9:123-136.
- Magne D, Seta N, Lebrun D, Durand G, Durand D. Factors influencing the reaction of alpha 1-fetoprotein with concanavalin A and Lens culinaris agglutinin in crossed immunoelectrophoresis. *Clin Chem* 1992;38:1418-1424.
- Wong RJ, Ahmed A, Gish RG. Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis-hepatocellular carcinoma and other disorders. *Clin Liver Dis* 2015;19:309-323.
- Christiansen M, Yazova AK, Karamova ER, Andreev AV, Goussev AI, Mortensen V, et al. Epitopes of human alpha-fetoprotein: Construction of an epitope-map from a large number of monoclonal antibodies. *J Tumor Marker Oncol* 1994;9:57-68.
- Carmichael J, Krantz D, Liu HP, Janik D, Hallahan T. Incorporation of dried blood alpha fetoprotein into traditional first trimester Down syndrome screening service. *Prenat Diagn* 2015;35:703-708.
- Zhang L, He T, Cui H, Wang Y, Huang C, Han F. Effects of AFP gene silencing on apoptosis and proliferation of a hepatocellular carcinoma cell line. *Discov Med* 2012;14:115-124.
- Semenkova LN, Dudich EI, Dudich IV, Shingarova LN, Korobko VG. Alpha-fetoprotein as a TNF-resistance factor for human hepatocarcinoma cell line HepG2. *Tumor Biol* 1997;18:30-40.
- Meng W, Bai B, Bai Z, Li Y, Yue P, Li X, Qiao L. The immunosuppression role of alpha-fetoprotein in human hepatocellular carcinoma. *Discov Med* 2016;21:489-494.
- Lin B, Zhu M, Wang W, Li W, Dong X, Chen Y, et al. Structural basis for alpha fetoprotein-mediated inhibition of caspase-3 activity in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2017;141:1413-1421.
- Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein binding proteins: implications for transmembrane passage and subcellular localization. *Life Sci* 1995;56:1-9.

23. Yu SJ. A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world: 2010-2016. *Clin Mol Hepatol* 2016;1:7-17.
24. Sharma D, Subbarao G, Saxena R. Hepatoblastoma. *Semin Diagn Pathol* 2017;34:192-200.
25. Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, McGrath-Morrow SA, Crawford TO, Lederman HM. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:159-180.
26. Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, Leto G, Bonfissuto G, Riili A, et al. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2003;23:1747-1753.
27. Hernández JC, Samada M, Roque A, Cruz Y, Howland I, Fernández I. Diagnostic value of alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma. *Biocología Aplicada* 2011;28:34-39.
28. Sarwar S, Khan AA, Tarique S. Validity of Alpha Fetoprotein for Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 2014;24:18-22.
29. Ahn D, Kim HJ, Kang H, Woong Lee H, Bae SH, Lee JH, et al. Feasibility of  $\alpha$ -fetoprotein as a diagnostic tool for hepatocellular carcinoma in Korea. *Korean J Intern Med* 2016;31:46-53.
30. Hu KQ, Kyulo NL, Lim N, Elhazin B, Hillebrand DJ, Bock T. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2004;99:860-865.
31. Nguyen MH, Garcia RT, Simpson PW, Wright TL, Keeffe EB. Racial differences in effectiveness of alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus cirrhosis. *Hepatology* 2002;36:410-417.
32. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int J Cancer* 2004;112:44-50.
33. Liu C, Xiao G, Yan L, Li B, Jiang L, Wen T, et al. Value of alpha-fetoprotein in association with clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19:1811-1819.
34. Hsu C-Y, Liu P-H, Lee Y-H, Hsia C-Y, Huang Y-H, Lin H-C, et al. Using Serum alpha-Fetoprotein for Prognostic Prediction in Patients with Hepatocellular Carcinoma: What is the Most Optimal Cutoff? *PLoS One* 2015;10:1-12.
35. Chou W, Lee C, Yang T, Huang C, Teng W, Tseng Y, et al. Changes in serum  $\alpha$ -fetoprotein level predicts treatment response and survival in hepatocellular carcinoma patients and literature review. *Journal of the Formosan Medical Association* 2017;1:1-11.
36. European Association for the Study of the Liver and European Organization for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908-943.
37. Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, de Lope CR, Ayuso C, et al. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;50:791-798.
38. Saffroy R, Pham P, Reffas M, Takka M, Lemoine A, Debuire B. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1169-1179.
39. Song P, Xia J, Inagaki Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Kokudo N, et al. Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016;22:262-274.
40. Lin J, Yan F, Ju H. Noncompetitive enzyme immunoassay for alpha-fetoprotein using flow injection chemiluminescence. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;117:93-102.
41. Korekane H, Hasegawa T, Matsumoto A, Kinoshita N, Miyoshi E, Taniguchi N. Development of an antibody-lectin enzyme immunoassay for fucosylated  $\alpha$ -fetoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:1405-1411.
42. Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, Venook AP, Reddy KR, Satomura S, et al. Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:104-113.
43. Kagebayashi C, Yamaguchi I, Akinaga A, Kitano H, Yokoyama K, Satomura M, et al. Automated immunoassay system for AFP-L3% using onchip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. *Anal Biochem* 2009;388:306-311.
44. Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, et al. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep* 2011; 26:1227-1233.
45. Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, et al. The utility of AFP-L3% in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a U.S. referral population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:394-402.
46. Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;1:57-63.
47. Tamano K, Sugiura M, Natsuki J, Sawakami-Kobayashi K, Tajima H, Machida M. Improvement of the lectin-antibody enzyme immunoassay of the alpha-fetoprotein carbohydrate chain for automation with the enzyme immunoassay robot. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69:1616-1619.
48. Kagebayashi C, Yamaguchi I, Akinaga A, Kitano H, Yokoyama K, Satomura M et al. Automated immunoassay system for AFP-L3% using on-chip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. *Anal Biochem* 2009;388:306-311.
49. Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAII) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl

- transferase [GGTII] as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003; 88:1878-1882.
50. Cui R, Wang B, Ding H, Shen H, Li Y, Chen X. Usefulness of determining a protein induced by vitamin K absence in detection of hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:42-45.
  51. Dohmen K, Shigematsu H, Irie K, Ishibashi H. Clinical characteristics among patients with hepatocellular carcinoma according to the serum levels of alpha-fetoprotein and des-g-carboxy prothrombin. *Hepatogastroenterology* 2003; 50:2072-2078.
  52. Saitta C, Raffa G, Alibrandi A, Brancatelli S, Lombardo D, Tripodi G, et al. PIVKA-II is a useful tool for diagnostic characterization of ultrasound-detected liver nodules in cirrhotic patients. *Medicine* 2017;96:1-5.
  53. Feng X, Song P, Bie P, Jiang P, Ma K, Li X, et al. Des-g-carboxyprothrombin plasma level in diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in a Chinese population undergoing surgery. *Med Sci Monit* 2016;22:1663-1672.
  54. Ji J, Wang H, Li Y, Zheng L, Yin Y, Zou Z, et al. Diagnostic Evaluation of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin versus -Fetoprotein for Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in China: A Large-Scale, Multicentre Study. *PLoS One* 2016;11:1-17.
  55. Park H, Park JY. Clinical Significance of AFP and PIVKA-II Responses for Monitoring Treatment Outcomes and Predicting Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Bio-Med Research International* 2013;1:1-6.
  56. De J, Shen Y, Qin J, Feng L, Wang Y, Yang L. A Systematic Review of Des-g-Carboxy Prothrombin for the Diagnosis of Primary Hepatocellular Carcinoma. *Medicine* 2016;95:1-10.
  57. Abd El Gawad IA, Mossallam GI, Radwan NH, Elzawahry HM, Elhifnawy NM. Comparing prothrombin induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II) with the oncofetal proteins glypican-3, Alpha feto protein and carcinoembryonic antigen in diagnosing hepatocellular carcinoma among Egyptian patients. *J Egypt Natl Canc Inst* 2014;26:79-85.
  58. Ishijima M, Nomura F, Horikoshi A, Ohnishi K, Nakai T. Determination of PIVKA-II levels in patients with small hepatocellular carcinoma--comparison of new sensitive methods. *Rinsho Byori* 1996;44:635-639.

ARTÍCULO ORIGINAL

# Efecto de la inhalación de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires: alteraciones histomorfológicas, metabólicas y bioquímicas a nivel pulmonar y extrapulmonar en ratones jóvenes y adultos mayores

Orona, Nadia Soledad<sup>1,2\*</sup>; Astort, Francisco<sup>1,2</sup>; Ferraro, Sebastián Ariel<sup>1,2</sup>; Maglione, Guillermo Alberto<sup>3</sup>; Kurtz, Melisa<sup>1,2</sup>; Agosta, Eduardo Germán<sup>1</sup>; Mandalunis, Patricia Mónica<sup>3</sup>; Morales, Celina<sup>4</sup>; Tasat, Deborah Ruth<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular del Pulmón, Centro de estudios en Salud y Medio Ambiente, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín. Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

<sup>3</sup>Cátedra de Histología y Embriología Humana, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

<sup>4</sup>Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

**Contacto:** Orona, Nadia Soledad, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín, Martín de Irigoyen 3100, (1653) San Martín, Buenos Aires, Argentina; naorona@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** numerosos estudios han demostrado que la contaminación del aire se asocia a efectos adversos para la salud. Específicamente, datos epidemiológicos muestran asociación entre la exposición al material particulado aéreo (MP) e incrementos en la morbi-mortalidad por enfermedades cardiopulmonares. Las partículas de menor tamaño pueden ser trasladadas desde los pulmones a la circulación y afectar órganos extrapulmonares como corazón e hígado. Sin embargo, el MP no afecta de igual manera a todas las personas, puesto que la edad es un parámetro que puede influir en los efectos del MP sobre la salud. **Objetivo:** estudiar *in vivo*, en dos poblaciones etarias (ratones jóvenes y envejecidos) los mecanismos biológicos mediante los cuales las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) podrían inducir efectos adversos en el sistema respiratorio y en órganos extrapulmonares. **Materiales y Métodos:** se emplearon ratones BALB/c jóvenes (3 meses de edad) o envejecidos (9 meses de edad) y se expusieron mediante instilación intranasal a UAP-BA o ROFA (sucedáneo de la contaminación aérea). Se analizó la respuesta biológica en pulmón, corazón e hígado a nivel metabólico (parámetros oxidativos e inflamatorios), bioquímico (biomarcadores séricos) e histomorfológicos a las 3, 24 y 48 hs post-instilación. **Resultados:** ambos MP provocaron una respuesta inflamatoria local y sistémica. En el pulmón, histológicamente se observó una reducción del área alveolar, en el corazón inflamación epicárdica y en el hígado inflamación y esteatosis con aumento en los niveles de enzimas transaminasas séricas en ambos grupos etarios. **Conclusión:** se demostró que UAP-BA, en un modelo experimental murino, altera no sólo el sistema respiratorio sino también órganos extrapulmonares como corazón e hígado. Por ello, se hipotetizó que UAP-BA podría potencialmente provocar una respuesta biológica adversa similar en individuos jóvenes y adultos que habitan la Ciudad de Buenos Aires.

**Palabras Clave:** contaminación ambiental aérea urbana, pulmón, corazón, hígado, inflamación, metabolismo oxidativo.

## Abstract

**Introduction:** Numerous studies have shown that air pollution is consistently associated with adverse health effects. Epidemiological data have specifically shown an association between the exposure to air particulate matter (PM) and an increase in cardiorespiratory morbidity/mortality. Smaller particles can be translocated from the lungs into the circulation and affect extrapulmonary organs such as the heart and liver. However, PM does not equally impact all the population, since the effects of MP on health may be influenced by age. **Objective:** to study *in vivo* the biological mechanisms by which Buenos Aires Urban Air Particles (UAP-BA) could induce adverse effects on the respiratory system and extrapulmonary organs of young and adult mice. **Materials and Methods:** young (3 months

old] and adult [9 months old] BALB/c mice were exposed to UAP-BA or ROFA (surrogate of airborne contamination) by intranasal instillation. In the lung, heart and liver, the biological response was assessed metabolically (oxidative and inflammatory parameters), biochemically (serum biomarkers), and histomorphologically at 3, 24 and 48 h post-instillation. Results: both types of PM caused local and systemic inflammatory response. Histologically, we observed a reduction of the alveolar area in the lung, heart epicardial inflammation, and liver inflammation and steatosis with an increase in the levels of serum transaminases in both age groups. Conclusions: we showed in a murine experimental model that UAP-BA altered not only the respiratory system but also extrapulmonary organs such as the heart and liver. Therefore, we hypothesized that UAP-BA could potentially induce similar adverse biological effects on young and adult individuals living in the City of Buenos Aires.

**Key words:** urban air pollution, lung, heart, liver inflammation, oxidative metabolism.

## Introducción

La contaminación atmosférica es una mezcla heterogénea de gases, líquidos y material particulado (MP). Estudios epidemiológicos han mostrado que, en las grandes ciudades, existe una correlación positiva entre la calidad del aire y la salud de sus habitantes [1-4]. Estos estudios muestran asociación entre los niveles de MP y la morbo-mortalidad por enfermedades respiratorias y cardiovasculares [5-10].

El efecto del MP depende de su tamaño y composición fisicoquímica. Cuanto menor es el tamaño del MP, mayor es su reactividad y posible toxicidad [11]. Las partículas aéreas finas (MP<sub>2,5</sub>) y ultrafinas (MP<sub>0,1</sub>) pueden impactar directa y localmente a nivel pulmonar o traslocar e impactar en órganos a distancia como corazón e hígado [12,13]. Asimismo, estas partículas ejercen un efecto indirecto y sistémico a través de mediadores oxidativos y/o inflamatorios generados a nivel pulmonar.

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la contaminación atmosférica en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca cada año 3,7 millones de defunciones prematuras, consecuencia principalmente de la exposición al MP, el cual puede impactar en distintos tejidos del organismo causando principalmente asma, bronquitis crónica, arritmia cardíaca, ataques cardíacos y cáncer.

La Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), es una megaciudad con 2.8 millones de habitantes [14], en la que se ha identificado que la fuente primaria de contaminación aérea es la emisión vehicular, siendo esta responsable de más del 90 % de la contaminación ambiental de la ciudad [15]. Previamente, este grupo de trabajo [16] ha encontrado que en ciertas ocasiones el MP<sub>2,5</sub> de la ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) excede los valores estándares establecidos por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) y por la OMS [17,18].

Si bien el MP afecta a toda la población, la susceptibilidad a la contaminación puede variar con la salud o la edad de los individuos. En este sentido, se identifican a los lactantes, los mayores de 65 años (adultos mayores) y los individuos con fallas cardiorrespiratorias previas como subpoblaciones de riesgo [19-22]. Demográficamente, CABA presenta el índice

de personas mayores de 60 años más alto de nuestro país, alcanzando un 16,4 %. Por lo tanto, el impacto de factores ambientales, como la contaminación aérea en la población envejecida crece en importancia [23].

En este contexto, el objetivo de este trabajo es estudiar *in vivo* en dos poblaciones etarias diferentes (ratones jóvenes y adultos mayores) los mecanismos biológicos, mediante los cuales las partículas aéreas urbanas de Buenos Aires (UAP-BA) podrían inducir efectos adversos en el sistema respiratorio y en órganos extrapulmonares. Para ello, se analizó la respuesta en pulmón, corazón e hígado a la exposición de UAP-BA y un sucedáneo de la contaminación ambiental aérea ROFA (por sus siglas en inglés-Residual Oil Fly Ash) a nivel metabólico (parámetros oxidativos e inflamatorios), bioquímico (biomarcadores séricos) e histomorfológico.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se utilizaron ratones BALB/c machos jóvenes (1 - 3 meses) y envejecidos (10 - 12 meses) provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares recibiendo agua y comida *ad libitum* con un ciclo 12:12 horas luz-oscuridad y temperatura ambiente controlada de 22 - 24°C, en el bioterio del Centro de Salud y Medio Ambiente, Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín. Para el uso y cuidado de animales de laboratorio se siguieron las directivas del NIH (National Institute of Health) [24], los lineamientos de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) y la normativa de referencia para Bioterios: Disposición N°6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

### Recolección y caracterización del material particulado (UAP-BA y ROFA)

Las partículas Aéreas Urbanas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) se recolectaron en la zona de Villa del Parque, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, caracterizada por un alto tránsito vehicular principalmente de automóvi-

les y colectivos [25]. Para el muestreo de UAP-BA se utilizó un Mini Vol sampler (Airmetrics, Eugene, OR, USA) de flujo 1,8 L/min en filtros de teflón (47 mm, Sartorius, 0,2 µm). Los filtros se pesaron (luego de equilibrar su humedad) antes y después de recolectar las partículas para determinar su peso neto, empleando una micro balanza (Mettler M3, precisión de 1 µg), que utiliza una fuente Alfa para remover la carga electrostática.

Las partículas provenientes del residuo volátil de la quema de petróleo, ROFA (Por sus siglas en inglés *-Residual Oil Fly Ash-*) se recolectaron en la planta industrial petrolífera de Mystic River, Everett, MA, USA y son una donación del Dr. J. Godleski, de la Escuela de Salud Pública de Harvard, Boston, MA, USA. Estas partículas son ampliamente utilizadas en toxicología ambiental como análogas de material particulado ambiental aéreo [25-28].

El análisis morfológico de las partículas se realizó mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), empleando un microscopio SEM Philips 515. El análisis de la composición química elemental se realizó mediante espectroscopía dispersiva de rayos X (EDX 4100, detector Si/Li y ventana de Be).

#### Diseño experimental: Modelo de exposición agudo a las partículas ambientales (UAP-BA y ROFA)

Animales, jóvenes o envejecidos, se anestesiaron por vía intraperitoneal (ip) con Xilazina 2 % / Ketamina 50 mg/ml en solución salina (1 ml/Kg de peso corporal), y se instilaron por vía intranasal [29] con una única dosis de 50 µl, por goteo en ambos orificios nasales, de una de suspensión de UAP-BA, ROFA o solución vehículo. Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos:

- Grupo ROFA (n = 15): se instilaron con una suspensión de ROFA (1 mg/kg de peso corporal) en Buffer Fosfato Salino estéril (PBS, 1X, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [30].
- Grupo UAP-BA (n = 15): se instilaron con una suspensión de UAP-BA en PBS 1X (1mg/kg de peso corporal) [25].
- Grupo CONTROL (n = 15): se instilaron con un volumen equivalente de PBS 1X utilizado como vehículo en las suspensiones de las partículas.

La eutanasia de los animales se realizó a las 3, 24 o 48 h luego de finalizado el protocolo de exposición. La respuesta biológica se analizó en los tres grupos experimentales mediante los siguientes parámetros: 1) inflamatorios, 2) oxidativos, 3) histológicos y 4) bioquímicos.

#### Análisis histológico de los tejidos

Se resecaron el pulmón, corazón e hígado de los ratones controles y expuestos al MP, se fijaron en formol (10 %) por no más de 48 horas y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de entre 5 y 7 µm de espesor (micrótomo Reichert-Jung, Nossloch, Alemania) y se colorearon con Hematoxilina y Eosina para evaluar los cambios histológicos generales e identificar los tipos celulares en los infiltrados inflamatorios. Los cortes se observaron en microscopio con

sistema de captura de imágenes (Leica Microsystems AG, Alemania).

La severidad de la lesión en el corazón fue evaluada según los criterios semicuantitativos establecidos por Herman [31]. Este sistema de clasificación se basa en el porcentaje de cardiomiocitos que muestran pérdida miofibrilar, vacuolización citoplasmática e infiltrado inflamatorio:

- Grado 0 = no hay daño;
- Grado 1 = < 5 %;
- Grado 1,5 = 5 - 15 %;
- Grado 2 = 16 - 25 %;
- Grado 2,5 = 26 - 35 %;
- Grado 3 = > 35 %.

El análisis histopatológico se llevó a cabo en el ventrículo izquierdo, ventrículo derecho, septum y células mesoteliales del epicardio.

La gravedad de la lesión hepática fue evaluada tomando como base los criterios semicuantitativos descritos para la esteatohepatitis no alcohólica [32]. Este sistema de clasificación se basa en la esteatosis, lesión de los hepatocitos e inflamación lobular.

#### Parámetros inflamatorios

1. **Lavado bronqueo alveolar (BAL):** La técnica del BAL empleada fue desarrollada por Brain [33] y modificada por Tasat y De Rey [34]. A brevedad, se practicó la eutanasia de los animales mediante una sobredosis de Clorhidrato de Ketamina (Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) por vía intraperitoneal e inmediatamente se expuso, canuló y perfundió la tráquea con 1 ml de PBS 1X (frío, libre de Ca y Mg, pH 7,2 - 7,4). Con el fin de obtener una cantidad óptima de células, el lavado con PBS 1X se repitió 12 veces. La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 800xg a 4°C y el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1X.
2. **Recuento celular total y diferencial:** El recuento de células totales obtenidas en el BAL se realizó en cámara de Neubauer. El recuento celular diferencial se evaluó sobre extendidos celulares (0,5 - 1 x 10<sup>5</sup> células), los que se fijaron en metanol (10 minutos) y se colorearon con Hematoxilina-Eosina, para poder distinguir las diferentes subpoblaciones celulares: Macrófagos Alveolares (MA), Polimorfonucleares (PMN) y Linfocitos (LIN). El número de MA, PMN o LIN se informó como porcentaje del número celular total.
3. **Determinación de la citoquina proinflamatoria IL-6:** La determinación a nivel sistémico de la citoquina IL-6 en el suero de los animales se realizó mediante la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés *-enzyme-linked immunosorbent assay*) (BD Pharmingen, San Diego, USA). En una placa de 96 pocillos se adicionó el anticuerpo de captura contra la citoquina (1 / 250 en carbonato de sodio 0,1 M pH 9,5), durante 12-14 horas a 4°C. Luego se lavó con buffer de lavado (PBS 1X - 0,05 % Tween 20) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se bloqueó por 1 hora

con buffer de bloqueo 10 % Suero Fetal Bovino (SFB) en PBS 1X. Posteriormente, la placa se lavó y las muestras y la citoquina patrón se sembraron e incubaron durante 2 horas. El anticuerpo de detección biotinilado (1 / 250 en buffer de bloqueo) se agregó e incubó durante 1 hora. Nuevamente se lavó, adició estreptoavidina conjugada a peroxidasa y luego de 30 minutos y en oscuridad se agregó 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hasta observar color. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 655 nm (Lector de placas -Bio-Rad, PowerPac, Basic).

### Metabolismo oxidativo

1. **Generación de especies reactivas del oxígeno:** El estudio de las especies reactivas del oxígeno (ROS), principalmente la producción intracelular del anión superóxido ( $O_2^-$ ), se realizó en el BAL de los animales de los 3 grupos experimentales mediante el ensayo del nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), según el método descrito por Hedley y Currie [35]. Las células obtenidas en el BAL se incubaron con una solución final de NBT (0,05 % en PBS) bajo agitación en un baño termostático (Dubnoff-Vicking, Argentina) durante 60 minutos a 37°C. Luego, el NBT se descartó y las células se fijaron con p-formaldehído 4 % (MP Biomedicals, Inc., Alemania) durante 10 minutos. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 800xg durante 10 min, el sobrenadante se descartó y se agregaron 400  $\mu$ l de polivinilpirrolidona (0,1 % en  $H_2O$  bidestilada) por muestra. Para todos los grupos experimentales se realizaron extendidos por duplicado y las células fueron cuantificadas por microscopía óptica (Nikon Alphaphot-2 V52, Melville, Nueva York, USA). El resultado se informó como el porcentaje de células reactivas, considerando células reactivas aquellas que redujeron el NBT.

2. **Determinación de antioxidantes: Superóxido Dismutasa y Catalasa:** Para las determinaciones de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa se pesaron y disgregaron los pulmones y corazones de los animales de los tres grupos experimentales mediante disrupción mecánica en PBS 1X (5 ml/gr tejido). Los homogeneizados se centrifugaron 10 min a 800xg a 4°C y los sobrenadantes se guardaron a -20°C hasta su evaluación.

**Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD):** para la evaluación de la actividad de la SOD, a 2,95 ml de buffer glicina (50 mM, pH= 10,8) se le agregaron 50  $\mu$ l de adrenalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (60 mM pH = 2) y se registró la absorbancia a 480nm cada 10 segundos durante 1 minuto (Espectrofotómetro Shimadzu UV-1201V, Tokio, Japón). La SOD es capaz de inhibir la oxidación de la adrenalina a adenocromo, definiéndose una unidad de actividad SOD como la cantidad de enzima de una muestra capaz de causar el 50 % de inhibición. Esta evaluación se determinó, también, luego del agregado de 10 y 30  $\mu$ l de homogeneizado de pulmón o corazón, para luego comparar las cinéticas de la oxidación

de la adrenalina en ausencia o presencia de las muestras [36]. La actividad relativa de la SOD se calculó como la capacidad de esta de inhibir la tasa de oxidación de la adrenalina, y los resultados se expresaron como unidades de actividad SOD por mg de proteínas [37].

**Actividad de la catalasa (CAT):** la determinación de la actividad de la CAT se realizó siguiendo la disminución de  $H_2O_2$  a través de la absorbancia a 240 nm en función del tiempo [38]. Para esta determinación, 30  $\mu$ l del homogenizado de pulmón o corazón se agregaron a 2,97 ml de buffer fosfato (100 mM, pH= 7,2) y se midió la absorbancia basal de la muestra a 240 nm. Después, se agregaron 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  8,8 M, y la absorbancia se registró cada 10 segundos durante 1 minuto. Esta reacción es de pseudo primer orden, por lo que se grafica el  $\ln(Abs_{240nm})$  en función del tiempo. La cantidad de catalasa de las distintas muestras se calculó a partir de la pendiente de esta curva, que representa el tiempo de vida media de esta enzima. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteínas totales.

### Parámetros Bioquímicos

El análisis bioquímico a nivel sistémico se realizó en muestras de sangre tomadas de animales de los tres grupos experimentales. La sangre se recolectó por punción cardíaca y se obtuvo el suero por centrifugación a 13800xg durante 10 minutos. Se evaluaron en el perfil lipídico: colesterol total (Col Tot), lipoproteína de alta densidad (C-HDL) y triglicéridos (TG) y en el perfil enzimático: aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).

1. **Perfil lipídico:** Los niveles séricos de Col Tot y TG se cuantificaron por métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador COBAS C501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La concentración de C-HDL se determinó mediante métodos de precipitación selectivos que emplean ácido fosfotúngstico en presencia de iones de magnesio [39].

2. **Perfil enzimático:** Las actividades enzimáticas de ALT y AST fueron determinadas por métodos cinéticos en un autoanalizador Beckman (Beckman Coulter INC, Brea, USA).

### Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los experimentos se repitieron tres veces para ambos grupos etarios y para todas las variables estudiadas. El tratamiento estadístico se realizó mediante ANOVA (análisis de varianza) de dos factores y según corresponda el post- test de Newman-Keuls o Bonferroni para revelar la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### Resultados

#### Caracterización fisicoquímica de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires

El análisis morfoquímico de las partículas aéreas urbanas de Buenos Aires (UAP-BA) muestra partículas esféricas

de tamaño heterogéneo con predominancia de partículas pequeñas menores a 2,5 micrones ( $MP_{2,5}$ ), presentando un núcleo carbonoso con trazas de algunos metales identificándose principalmente los siguientes elementos: Al, Si, K, Mg, Fe, S, Cl, y Cu (Figura sup 1 y 2).

### Análisis Histomorfológico

#### Histología pulmonar

Con el fin de evaluar posibles alteraciones en el tejido pulmonar de ratones jóvenes o envejecidos expuestos a ROFA o UAP-BA en distintos tiempos, se realizaron análisis de cortes histológicos de pulmón. La instilación aguda de ambas partículas ambientales aéreas provocó alteraciones en la histología pulmonar de ratones jóvenes mostrando una respuesta inflamatoria, caracterizada por una reducción en el espacio aéreo alveolar debido a la infiltración celular compuesta principalmente de linfocitos y células polimorfonucleares (Figura sup 3 A-I). En los animales envejecidos la respuesta inflamatoria se observó focalizada a las 3 horas post-instilación tanto para ROFA (Figura 1B) como UAP-BA (Figura 1C), mientras que a las 24 y 48 horas post-instilación se observó infiltración de tipo difusa (Figura 1E, H, F, I).

#### Histología Cardíaca

A nivel cardíaco, la exposición a las partículas ambientales aéreas indujo cambios histopatológicos sólo en el ventrículo derecho (VD) de los animales envejecidos (Figura 2). Los corazones de los animales controles presentaron un miocardio y epicardio normal (Grado = 0). Por el contrario, el epicardio del VD de los ratones instilados con ROFA, a las 3 horas post-instilación mostró la presencia focal de células mesoteliales reactivas (Figura 2B), mientras que en el VD de los animales expuestos a UAP-BA se observó dilatación

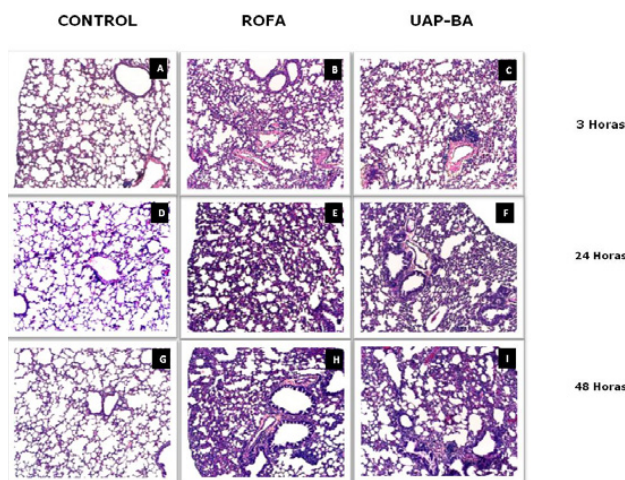
vascular, infiltrado inflamatorio en el epicardio e inflamación intersticial linfocitaria en el miocardio subepicárdico (Grado= 1) (Figura 2C). En ambos grupos de animales expuestos a las partículas, tanto a las 24 como a las 48 horas post-instilación, se observaron alteraciones en el epicardio y el miocardio subepicárdico (Figura 2E-F y H-I). La respuesta en el tiempo dependió del tipo de MP, siendo esta tisular a UAP-BA siempre más temprana que a ROFA.

#### Histología Hepática

La histología hepática correspondiente a ratones expuestos a ROFA o UAP-BA mostró claras diferencias en el parénquima y en las zonas vasculares en comparación con las correspondientes a ratones controles. La instilación intranasal de partículas ambientales aéreas provocó a nivel hepático inflamación intersticial compuesta principalmente por infiltración de linfocitos (LIN) y polimorfonucleares (PMN), necrosis (N) y esteatosis (S) en todo el parénquima afectando preferentemente la zona 3 (alrededor de la vena central, VC).

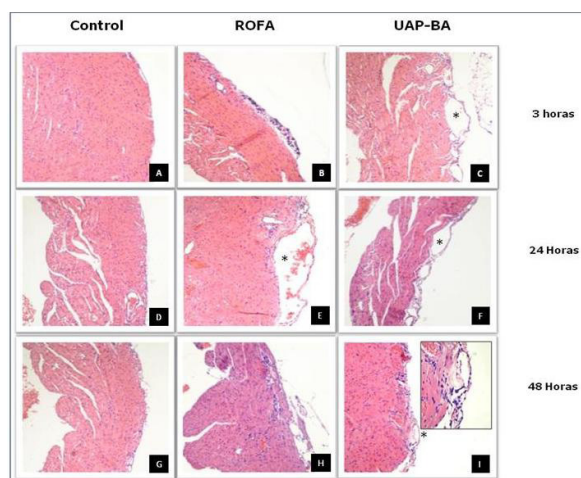
Los hígados de ratones jóvenes expuestos a ambos MP presentaron esteatohepatitis mixta [grado 1] a las 3 horas post- instilación, aumentando marcadamente a las 24 horas post-instilación (Figura sup 4B1-B6). Los hígados de ratones envejecidos controles (Figura 3A) mostraron leve infiltración inflamatoria [grado 0] característica del envejecimiento del hígado, así como en los expuestos a ambos MP se observaron focos aislados de necrosis, infiltración inflamatoria moderada (LIN, PMN) y esteatohepatitis mixta [grado 1] a las 3 horas post- instilación. Esta respuesta leve fue aumentando en gravedad a través del tiempo, observándose a las 48 horas post-instilación una esteatosis

**Figura 1.** Microfotografías del tracto respiratorio inferior de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo. Coloración H&E. Ori. Mag. 100X.



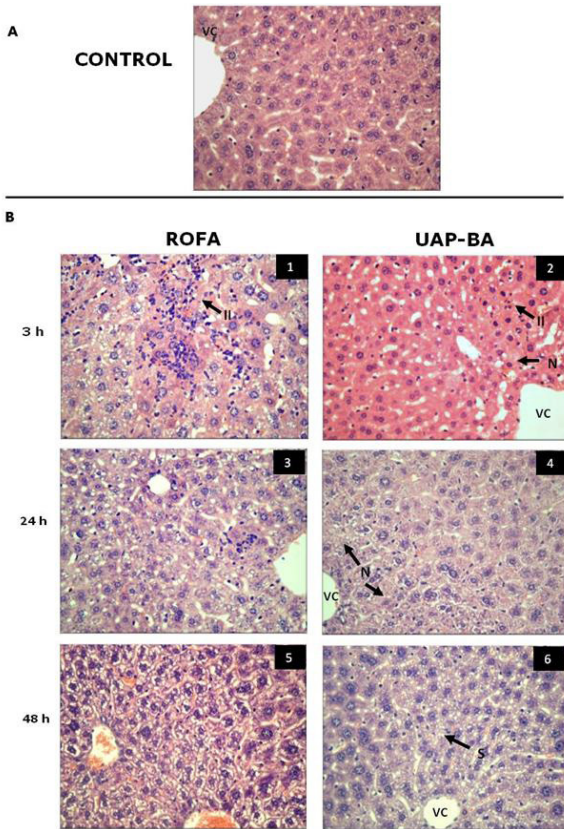
► Nótese el aumento de infiltrado de células inflamatorias para ambas partículas ambientales aéreas y para todos los tiempos ensayados.

**Figura 2.** Microfotografías del ventrículo derecho de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo. Coloración H&E. Ambos tipos de partículas provocaron reacción inflamatoria del epicardio del ventrículo derecho Mag. Ori. 100X.



► El asterisco [\*] muestra dilatación vascular e infiltrado inflamatorio. 6-I: El recuadro destaca la zona afectada con mayor aumento (200X).

**Figura 3.** Microfotografías de hígados de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► A: control. B expuestos a las partículas. Ambos tipos de partículas provocaron una reacción inflamatoria. (II) Inflamación Intersticial, Necrosis (N), Esteatosis (E), Vena Central (VC). Mag Orig. 400X

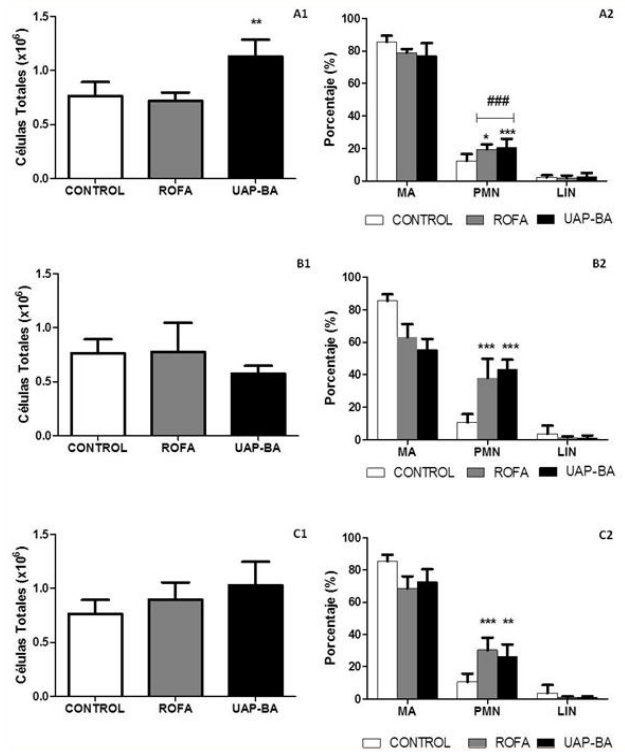
más intensa llegando a clasificarse como de grado 3 (Figura 3B5-B6).

**Parámetros inflamatorios a nivel pulmonar**  
**Recuento Celular Total y Diferencial en el BAL**

El número de células totales (RCT) y la composición celular diferencial (RCD) del lavado bronqueoalveolar (BAL) es un indicador de la respuesta inflamatoria y del reclutamiento de células al sitio de inflamación.

En animales jóvenes, ROFA presentó valores del RCT similares al grupo control para todos los tiempos ensayados (Figura 4A1-C1). En cambio, la exposición a UAP-BA estimuló un aumento significativo del RCT sólo a las 3 horas post-institilación (Figura 4A1). En animales envejecidos, sólo la exposición a ROFA, a las 3 horas post-institilación, estimuló el aumento del RCT respecto de los animales controles (Figura 5A1). A diferencia de ROFA, UAP-BA no provocó un aumento significativo del RCT a través del tiempo (Figura 5A1-C1). Sin embargo, para las dos poblaciones etarias, ambas partículas ambientales aéreas provocaron una alteración en la distribución sub-poblacional, con un aumento significativo de células polimorfonucleares (PMN) respecto del grupo

**Figura 4.** Recuento Celular Total (RCT) y Diferencial (RCD) en el BAL de ratones jóvenes expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► La figura muestra la biocinética para RCT y RCD. A1 y A2): 3 horas, B1 y B2): 24 horas, C1 y C2): 48 horas post-institilación. MA: macrófagos alveolares, PMN: polimorfonucleares, LIN: linfocitos. Los datos representan el valor medio  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto del control. ### $p < 0,001$  entre ROFA y UAP-BA

control para todos los tiempos ensayados (Figura 4 A2-C2 y 5 A2-C2).

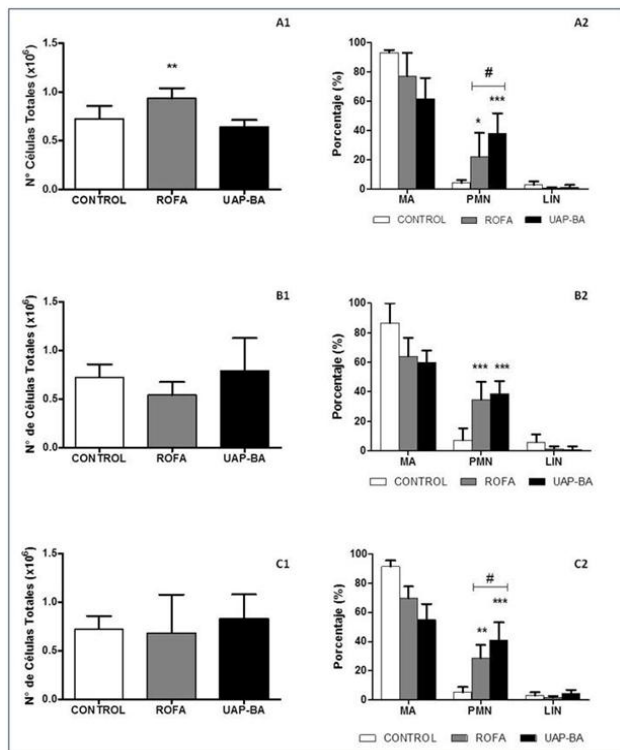
**Metabolismo Oxidativo**

El metabolismo oxidativo es uno de los parámetros biológicos comúnmente empleados para evaluar la respuesta local al MP. Su desbalance por aumento de especies oxidantes, disminución de especies antioxidantes o ambos, es indicativo de un posible daño a nivel celular. Se evaluó la generación de especies oxidantes en el BAL y la actividad de enzimas antioxidantes a nivel pulmonar y cardíaco.

**Generación de Anión Superóxido en el BAL**

El análisis de la generación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en el BAL de ratones BALB/c jóvenes mostró, a las 3 horas post-institilación, un aumento significativo sólo en las células provenientes de ratones expuestos a ROFA. En cambio, a las 24 y 48 horas post-institilación la exposición a ambos MP estimuló significativamente la generación de esta especie reactiva del oxígeno (Figura 6A). En el BAL de los ratones envejecidos, para ambos tipos de partículas ambientales aéreas se observó una respuesta similar y dependiente

**Figura 5.** Recuento Celular Total (RCT) y Diferencial (RCD) en el BAL de ratones envejecidos expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► La figura muestra la biocinética para RCT y RCD. A1 y A2): 3 horas, B1 y B2): 24 horas, C1 y C2): 48 horas post-inhalación. MA: Macrófagos alveolares, PMN: polimorfonucleares, LIN: linfocitos. Los datos representan el valor medio  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  respecto del control. #  $p < 0,05$  entre ROFA y UAP-BA.

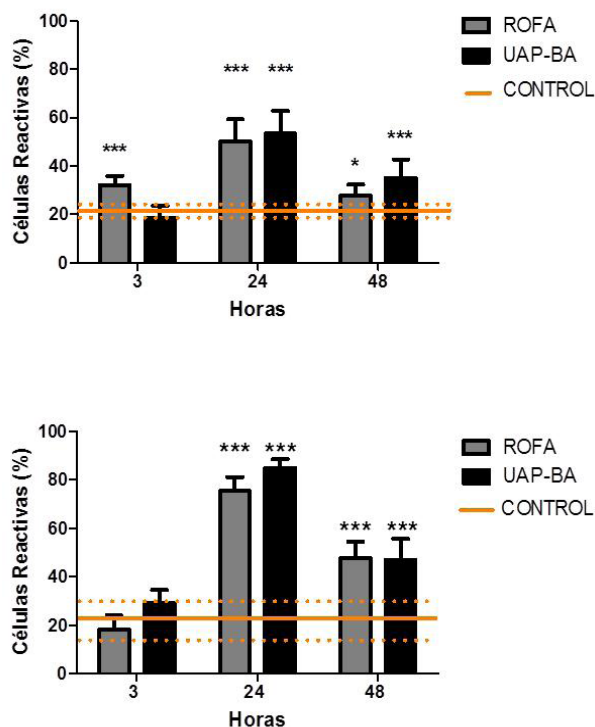
del tiempo. A las 3 horas post-inhalación, no se registraron cambios en la generación de  $O_2^-$  en el BAL de los animales expuestos a ROFA o UAP-BA. Sin embargo, a las 24 y 48 horas post-inhalación ambos tipos de partículas estimularon un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la generación de este radical libre (Figura 6B).

#### Actividad de enzimas antioxidantes en pulmón y corazón

Con el fin de determinar alteraciones en las defensas antioxidantes, se evaluaron a través del tiempo las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en homogeneizados de pulmón y corazón de animales controles y expuestos al MP.

Los pulmones de animales jóvenes expuestos a ROFA o UAP-BA no presentaron cambios en la actividad de la SOD respecto al grupo control, en ninguno de los tiempos ensayados (Figura 7A). En pulmones de animales envejecidos, la exposición a ROFA, a las 24 horas post-inhalación, provocó un aumento significativo de la actividad de la SOD. Tanto a las 3 como a las 48 horas post-inhalación los valores fueron similares a los basales. Los animales expuestos a UAP-BA no mostraron alteración en la actividad de la SOD para nin-

**Figura 6.** Generación de Anión Superóxido en células del lavado bronqueoalveolar de ratones jóvenes (A) o envejecidos (B) expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Las barras representan el valor medio  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  respecto del control. El valor del control se representa como una línea llena y el intervalo de dispersión como dos líneas punteadas

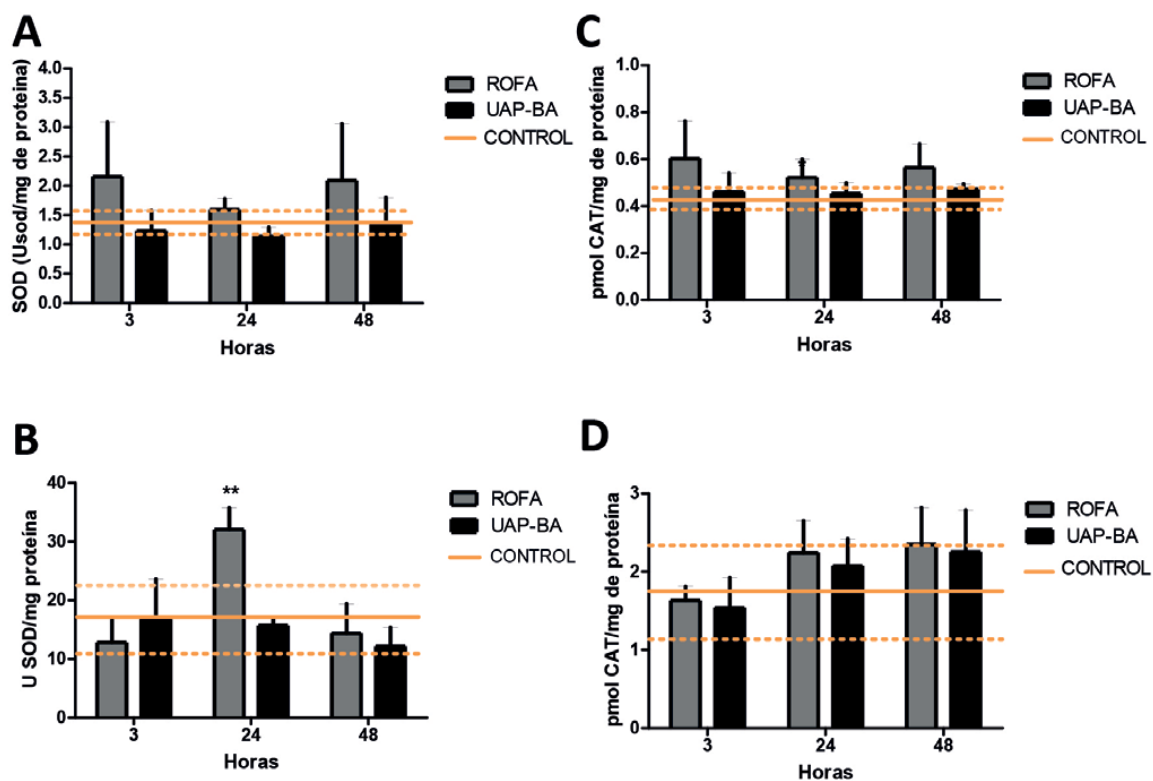
guno de los tiempos ensayados (Figura 7B). Tanto para animales jóvenes (Figura 7C) como envejecidos (Figura 7D) la actividad de la enzima CAT a nivel pulmonar se mantuvo sin cambios respecto del grupo control en el rango de tiempo ensayado.

A nivel cardíaco, los animales jóvenes expuestos al MP presentaron a las 24 horas post-inhalación una disminución de la actividad de la SOD (Figura 8A) y CAT (Figura 8C). En animales envejecidos, la actividad de la SOD aumentó, significativamente, sólo en los ratones expuestos a ROFA a las 24 y 48 horas post-inhalación. De manera similar a lo observado en el pulmón, a nivel cardíaco UAP-BA no provocó variaciones en la actividad de SOD a través del tiempo (Figura 8B). La biocinética de la actividad de la enzima CAT en los corazones de animales expuestos al MP se mantuvo sin cambios respecto del grupo control en el rango de tiempo ensayado (8D).

#### Respuesta sistémica a la exposición al MP

Con el fin de evaluar el efecto sistémico de ROFA y UAP-BA se dosaron en el suero de ratones controles y expuestos a las partículas ambientales aéreas, el perfil lipídico, enzimá-

**Figura 7.** Actividad en pulmón de la Superóxido Dismutasa y Catalasa de ratones jóvenes (A, C) o envejecidos (B, D) expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Las barras representan el valor medio  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$  respecto del control. El valor del control se representa como una línea llena y el intervalo de dispersión como dos líneas punteadas.

tico e inflamatorio como indicadores de daño a órganos e inflamación.

### Perfil lipídico

El análisis del perfil lipídico de los animales jóvenes (Tabla Sup 1) y envejecidos (Tabla Sup 2) expuestos a ROFA o UAP-BA no mostró cambios en los valores de colesterol total (Col Tot), lipoproteína de alta densidad (C-HDL) o triglicéridos (TG), respecto de los valores correspondientes al grupo control en ninguno de los tiempos ensayados.

### Perfil enzimático

Los indicadores sistémicos de posible daño en órganos como hígado y corazón, se evaluaron con un dosaje de los niveles séricos de Alanina aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST) de los animales controles y expuestos a ROFA o UAP-BA.

Los animales jóvenes expuestos a ambos MP mostraron niveles séricos elevados de la enzima AST sólo a las 3 horas post-institilación (Figura 9A). En cambio, la enzima ALT se mantuvo elevada para todos los tiempos estudiados (Figura 9A-C). En los animales envejecidos, la exposición al MP provocó un aumento en el nivel enzimático sérico de ALT a las 3 horas post-institilación, para ambos tipos de partículas

(Figura 9D). La enzima AST se encontró elevada sólo en el suero de los animales expuestos a UAP-BA a las 3 y 48 horas post-institilación (Figura 9D Y F).

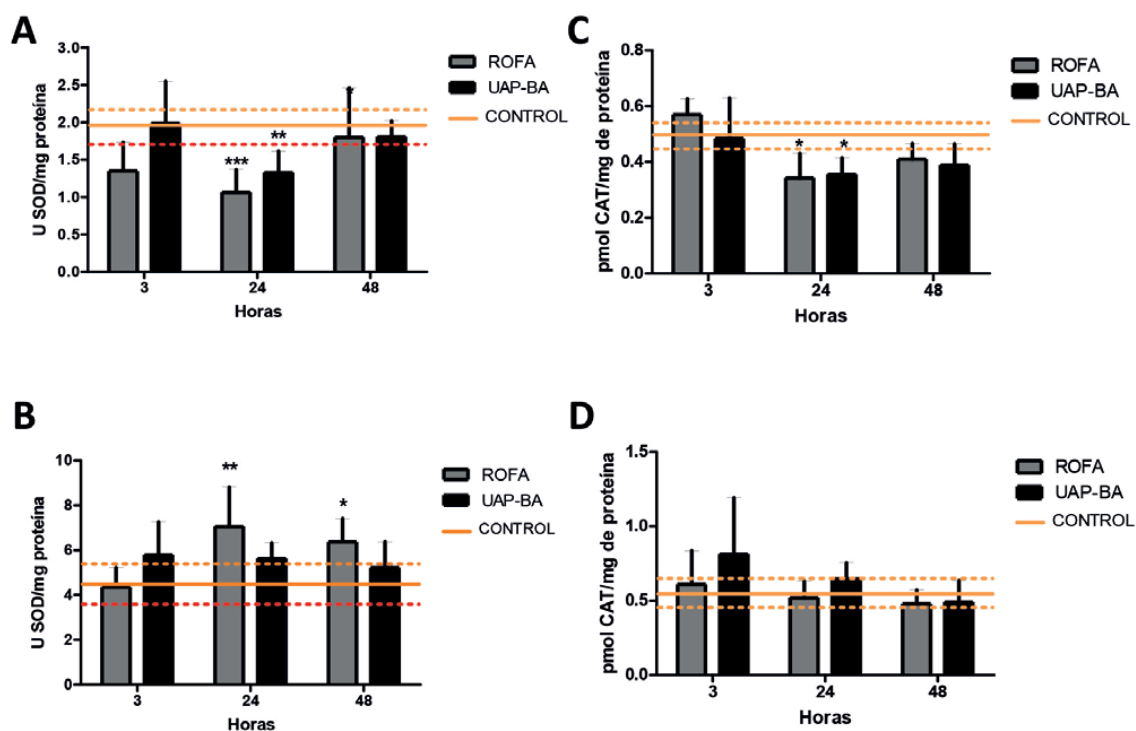
### Perfil inflamatorio

Como parámetro de inflamación sistémico, se evaluó la citoquina pro-inflamatoria interleuquina 6 (IL-6) en suero de animales controles y expuestos a ROFA o UAP-BA. Los animales jóvenes expuestos a cualquiera de las partículas ambientales presentaron un aumento en los niveles de IL-6 a las 3 horas post-institilación respecto de los controles, disminuyendo y alcanzando niveles basales a las 24 horas (Figura 10A). En concordancia, en los animales envejecidos ambas partículas ambientales aumentaron significativamente la liberación de esta citoquina a las 3 horas post-institilación. Sin embargo, el aumento provocado por ROFA en los niveles de IL-6 alcanzó su máximo a las 3 horas, manteniéndose significativamente elevada a las 24 horas hasta caer a niveles basales a las 48 horas. (Figura 10B).

### Discusión

La acción de las partículas en la salud depende no sólo de la composición química sino también de la concentración, tiempo de exposición a las mismas y del grupo etario

**Figura 8.** Actividad en corazón de la Superóxido Dismutasa y Catalasa de ratones jóvenes (A, C) o envejecidos (B, D) expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Las barras representan el valor medio  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  respecto del control. El valor del control se representa como una línea llena y el intervalo de dispersión como dos líneas punteadas.

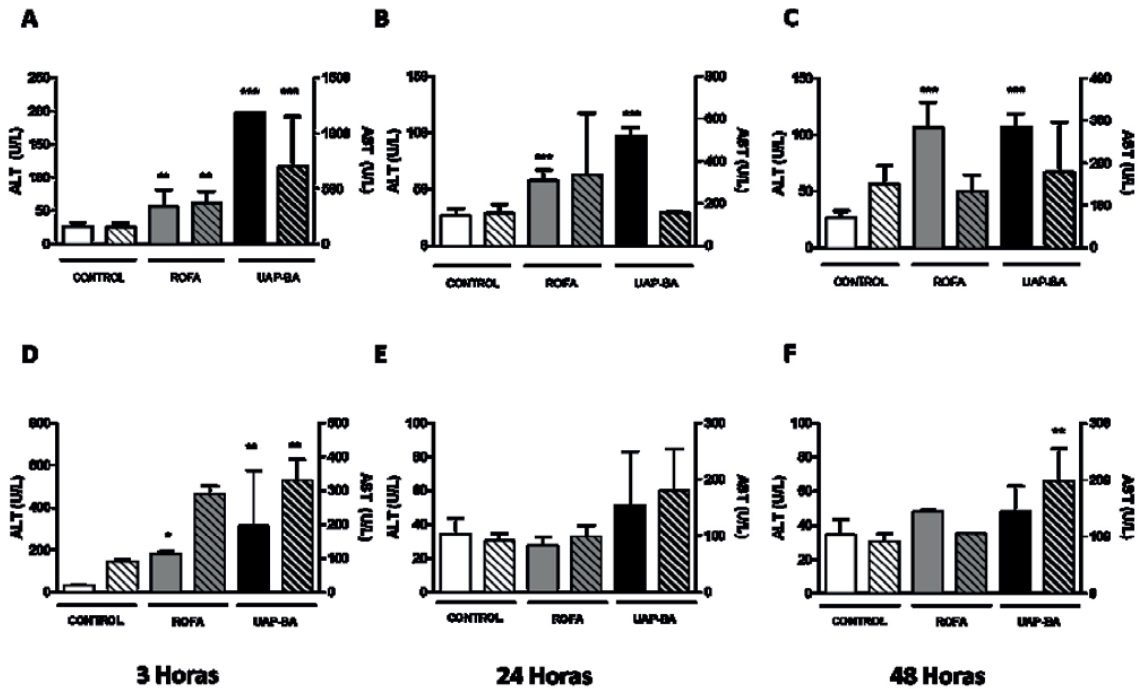
A nivel pulmonar, encontramos que en animales jóvenes expuestos a las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA), el recuento celular total (RCT) aumentó sólo tempranamente (3 horas post-instilación). Sin embargo, el porcentaje de polimorfonucleares (PMN) aumentó para todos los tiempos ensayados en las dos poblaciones etarias. En concordancia, la histología pulmonar mostró disminución del área alveolar debida a la infiltración de células inflamatorias. Por lo tanto, tal como sucede en otras megaciudades como Milano y Sao Paulo [40-42], en Buenos Aires las partículas urbanas causaron respuesta inflamatoria a nivel pulmonar en las dos poblaciones etarias estudiadas.

Las partículas ambientales aéreas, principalmente las ultrafinas, pueden actuar a nivel local sobre el sistema respiratorio como a distancia, llegando a órganos como hígado, corazón, bazo, cerebro [11,43-48]. Por ello, además de evaluar la respuesta local a nivel pulmonar, también se evaluó a nivel cardíaco y hepático la respuesta directa o indirecta al MP. En este sentido, encontramos que UAP-BA y ROFA, desencadenaron una respuesta de tipo inflamatoria caracterizada por infiltración leucocitaria en corazón e hígado, dilatación de los vasos en el epicardio cardíaco y zonas de necrosis a nivel hepático. Es importante señalar que a nivel cardíaco las señales indicativas de un proceso inflamatorio

aparecieron siempre más tempranamente en los animales expuestos UAP-BA que en los animales expuestos a ROFA. Esta respuesta podría ser consecuencia de diferencias en el tamaño aerodinámico y forma de estas dos partículas. Dado que UAP-BA es más pequeña que ROFA, UAP-BA podría translocarse rápidamente al sistema vascular, ejerciendo su efecto más tempranamente en órganos a distancias.

La respuesta inflamatoria en el sistema cardiorrespiratorio podría deberse a un desbalance oxidativo previo [49], por ello se abordó el análisis del metabolismo oxidativo en pulmón y corazón de los animales jóvenes y envejecidos expuestos al MP. En este contexto, a nivel pulmonar se comprobó que ambas partículas, independientemente de su composición química incrementaron la generación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en animales jóvenes y envejecidos. Es conocido que los metales son inductores de la generación de radicales libres [50], por eso, se sugiere que son los metales presentes en ROFA [51,52] los que, a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), inducen la expresión de mediadores inflamatorios provocando injuria pulmonar [28,51,53] y cardíaca [54,55]. No obstante, MacNee y Donaldson [56] propusieron que los metales presentes en el MP no son los únicos responsables de desencadenar desbalance oxidativo. En este sentido. UAP-BA

**Figura 9.** Concentración sérica de ALT (U/L) y AST (U/L) a través del tiempo. Ratones jóvenes (A, B, C) o envejecidos (D, E, F) controles (barras blancas), expuestos a ROFA (barras grises) o expuestos a UAP-BA (barras negras).



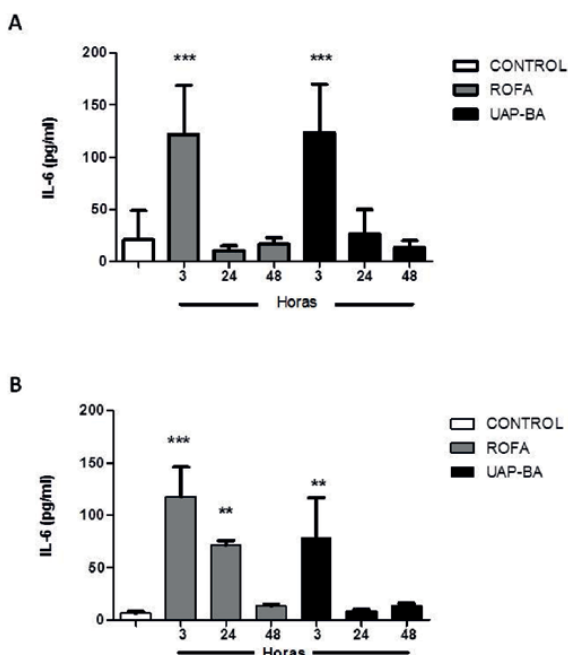
► Las barras representan el valor medio  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  respecto del control

se caracteriza por presentar alto contenido de compuestos volátiles orgánicos y bajas trazas metálicas. Estos resultados avalan la hipótesis de MacNee y Donaldson, la que sostiene que para los animales expuestos a UAP-BA, la vía de activación de señalización intracelular para la producción de ROS podría deberse a la fracción orgánica. En cuanto a la respuesta antioxidante, UAP-BA en ambas poblaciones no movilizó las enzimas SOD y CAT, sugiriendo un posible desbalance oxidativo a nivel pulmonar. Cabe destacar que, aunque en animales envejecidos ROFA movilizó la SOD [24 horas post-institación], histológicamente se observó daño a nivel pulmonar. A nivel cardíaco, para ambos MP, se encontró una reducción en la actividad de la SOD y CAT [24 horas post-institación] en animales jóvenes que mostraron alteración del metabolismo oxidativo. Sin embargo, en animales envejecidos la respuesta antioxidante fue dependiente del MP. Sólo ROFA movilizó SOD para compensar un posible aumento de especies activas del oxígeno evitando así el desbalance oxidativo. En cuanto a UAP-BA, la ausencia de respuesta antioxidante sumada a la rápida respuesta inflamatoria a nivel cardíaco sugeriría que este MP, posiblemente debido a su menor tamaño aerodinámico, posee un grado de toxicidad mayor que ROFA.

El desarrollo de enfermedades cardiovasculares y eventos cardíacos agudos asociados al MP [5,6-57] podría involucrar una respuesta sistémica [13]. Es por eso, que se estudió la respuesta sistémica a ROFA y UAP-BA mediante

biomarcadores séricos como la citoquina proinflamatoria interleuquina IL-6 (IL-6), y las enzimas Alanino aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST) en animales jóvenes y envejecidos. Respecto de la IL-6, se encontró un incremento en los niveles séricos de esta citoquina a las 3 horas post-exposición en animales expuestos a ROFA o UAP-BA de ambos grupos etarios. Este efecto está asociado a un aumento en la proporción de PMN y generación de ROS en el BAL, indicativo de un proceso inflamatorio pulmonar. En este sentido, Yu [58] demostró que la IL-6 juega un papel crítico en la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar en ratones luego de la exposición a contaminantes aéreos. En relación con las transaminasas, la enzima ALT es un conocido marcador de hepatotoxicidad y la AST de hepatotoxicidad y/o enfermedades cardiovasculares [59]. Si bien ambas enzimas responden al daño hepático, la concentración de ALT en suero es el biomarcador más común y mejor establecido para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad hepática aguda y crónica [60]. En animales jóvenes, la exposición a las partículas provocó aumento significativo en los niveles de ambas enzimas al menor tiempo estudiado [3 horas post-institación]. Estos resultados concuerdan con los publicados por Pan [61] donde reportan un aumento en los niveles de ALT en individuos expuestos a  $MP_{2,5}$ , además sugieren que la exposición a largo plazo aumenta el riesgo de cáncer de hígado, siendo la base de la patogénesis la inflamación crónica. Por otro lado, los animales expuestos a

**Figura 10.** Niveles séricos de IL-6 a través del tiempo. Ratones jóvenes (A) o envejecidos (B) controles, expuestos a ROFA o a UAP-BA.



► Las barras representan el valor medio  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  respecto del control.

ROFA recién a las 48 horas presentaron en su suero valores de ALT tres veces superior a los valores normales. Nuevamente, estas diferencias temporales podrían deberse al menor tamaño aerodinámico de UAP-BA. En animales envejecidos, sólo se encontró un aumento temprano (3 horas post-inhalación) en los niveles séricos de AST, coincidiendo con las alteraciones hepáticas y cardíacas observadas histológicamente.

En conclusión, los resultados obtenidos *in vivo* indican que la exposición aguda a ROFA y UAP-BA, independientemente del grupo etario, provocan una respuesta inflamatoria y oxidativa a nivel pulmonar. Asimismo, la liberación de mediadores inflamatorios y oxidativos pulmonares o las partículas *per se* pueden llegar a la circulación e impactar a nivel sistémico y en órganos a distancia.

Por ello, se sostiene la hipótesis de que UAP-BA podría potencialmente provocar una respuesta biológica adversa, similar en individuos jóvenes y adultos que habitan la Ciudad de Buenos Aires.

## Referencias bibliográficas

1. Pope CA, 3rd. Mortality effects of longer term exposures to fine particulate air pollution: review of recent epidemiological evidence. *Inhalation toxicology*. 2007;19 Suppl 1:33-8. doi: 10.1080/08958370701492961.
2. Pope CA, 3rd, Bates DV, Raizenne ME. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environmental health perspectives*. 1995;103(5):472-80.
3. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(4 Pt 1):539-54.
4. Kunzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*. 2000;356(9232):795-801. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02653-2.
5. Schwartz J, Wypij D, Dockery D, Ware J, Zeger S, Spengler J, et al. Daily diaries of respiratory symptoms and air pollution: methodological issues and results. *Environmental health perspectives*. 1991;90:181-7.
6. Brunekreef B, Forsberg B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *The European respiratory journal*. 2005;26(2):309-18. doi: 10.1183/09031936.05.00001805.
7. Schwela D. Air pollution and health in urban areas. *Reviews on environmental health*. 2000;15(1-2):13-42.
8. Dockery DW. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 4:483-6.
9. Moshhammer H, Hutter HP, Hauck H, Neuberger M. Low levels of air pollution induce changes of lung function in a panel of schoolchildren. *The European respiratory journal*. 2006;27(6):1138-43. doi: 10.1183/09031936.06.00089605.
10. Gauderman WJ, Vora H, McConnell R, Berhane K, Gilliland F, Thomas D, et al. Effect of exposure to traffic on lung development from 10 to 18 years of age: a cohort study. *Lancet*. 2007;369(9561):571-7. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60037-3.
11. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. Extrapulmonary translocation of ultra-fine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2002;65(20):1531-43. doi: 10.1080/00984100290071658.
12. Brook RD, Rajagopalan S. Particulate matter air pollution and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2010;12(5):291-300. doi: 10.1007/s11883-010-0122-7.
13. Franklin BA, Brook R, Arden Pope C, 3rd. Air pollution and cardiovascular disease. *Current problems in cardiology*. 2015;40(5):207-38. doi: 10.1016/j.cpcardi.2015.01.003.
14. INDEC CNhwcigaactp.

15. Bogó H, M. Otero, P. Castro, M.J. Azafrán, A. Kreiner, E.J. Calvo and R.M. Negri. Study of atmospheric particulate matter in Buenos Aires city. *Atmos Environ*. 2003;37:1135-47
16. Martin S, Dawidowski L, Mandalunis P, Cereceda-Balic F, Tasat DR. Characterization and biological effect of Buenos Aires urban air particles on mice lungs. *Environmental research*. 2007;105(3):340-9. doi: 10.1016/j.envres.2007.04.009.
17. EPA. PM Standards. The US Environmental Protection Agency. 2011.
18. WHO. Air Quality and Health. 2008.
19. Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Archives of environmental health*. 1995;50(2):159-63. doi: 10.1080/00039896.1995.9940893.
20. Braga AL, Zanobetti A, Schwartz J. Do respiratory epidemics confound the association between air pollution and daily deaths? *The European respiratory journal*. 2000;16(4):723-8.
21. Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Dockery DW, et al. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity and mortality from air pollution in the United States. Research report. 2000;94(Pt 2):5-70; discussion 1-9.
22. Pope CA, 3rd. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environmental health perspectives*. 2000;108 Suppl 4:713-23.
23. Abrutzky R, Dawidowski L, Murgida A, Natenzon CE. [Air contamination in the Autonomous City of Buenos Aires: the current risk or future climate change, a false option]. *Ciencia & saude coletiva*. 2014;19(9):3763-73.
24. NIH Publication - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.
25. Orona NS, Ferraro SA, Astort F, Morales C, Brites F, Boero L, et al. Acute exposure to Buenos Aires air particles (UAP-BA) induces local and systemic inflammatory response in middle-aged mice: A time course study. *Environmental pollution*. 2016;208(Pt A):261-70. doi: 10.1016/j.envpol.2015.07.020.
26. Marchini T, Magnani ND, Paz ML, Vanasco V, Tasat D, Gonzalez Maglio DH, et al. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;274(2):274-82. doi: 10.1016/j.taap.2013.11.013.
27. Delfosse VC, Tasat DR, Gioffre AK. In vivo short-term exposure to residual oil fly ash impairs pulmonary innate immune response against environmental mycobacterium infection. *Environmental toxicology*. 2015;30(5):589-96. doi: 10.1002/tox.21936.
28. Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environmental health perspectives*. 2002;110 Suppl 1:89-94.
29. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282(4):L833-9. doi: 10.1152/ajplung.00173.2001.
30. Marchini T, Magnani N, D'Annunzio V, Tasat D, Gelpi RJ, Alvarez S, et al. Impaired cardiac mitochondrial function and contractile reserve following an acute exposure to environmental particulate matter. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(3):2545-52. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.012.
31. Herman EH, Zhang J, Chadwick DP, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2000;45(4):329-34. doi: 10.1007/s002800050048.
32. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(42):5286-96.
33. Brain JD. The respiratory tract and the environment. *Environmental health perspectives*. 1977;20:113-26.
34. Tasat DR, de Rey BM. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environmental research*. 1987;44(1):71-81.
35. Hedley DW, Currie GA. Monocytes and macrophages in malignant melanoma. III. Reduction of nitroblue tetrazolium by peripheral blood monocytes. *British journal of cancer*. 1978;37(5):747-52.
36. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001;388(2):261-6. doi: 10.1006/abbi.2001.2292.
37. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(22):6056-63.
38. Maehly AC, Chance B. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis*. 1954;1:357-424.
39. Warnick GR, Mayfield C, Benderson J, Chen JS, Albers JJ. HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate-Mg<sup>2+</sup> and by dextran sulfate-Mn<sup>2+</sup>-polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method. *American journal of clinical pathology*. 1982;78(5):718-23.
40. Farina F, Sancini G, Battaglia C, Tinaglia V, Mantecca P, Camatini M, et al. Milano summer particulate matter (PM<sub>10</sub>) triggers lung inflammation and extra pulmonary adverse events in mice. *PLoS one*. 2013;8(2):e56636. doi: 10.1371/journal.pone.0056636.
41. Farina F, Sancini G, Mantecca P, Gallinotti D, Camatini M, Palestini P. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection. *Toxicology letters*. 2011;202(3):209-17. doi: 10.1016/j.

- toxlet.2011.01.031.
42. Riva DR, Magalhaes CB, Lopes AA, Lancas T, Mauad T, Malm O, et al. Low dose of fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhalation toxicology*. 2011;23(5):257-67. doi: 10.3109/08958378.2011.566290.
  43. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109(21):2655-71. doi: 10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8.
  44. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical science*. 2008;115(6):175-87. doi: 10.1042/CS20070444.
  45. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 4:547-51.
  46. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(9):1665-8. doi: 10.1164/ajrccm.164.9.2101036.
  47. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2002;65(20):1513-30. doi: 10.1080/00984100290071649.
  48. Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W, et al. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation*. 2004;109(10):1320-5. doi: 10.1161/01.CIR.0000118524.62298.E8.
  49. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical immunology*. 2003;109(3):250-65.
  50. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*. 2005;12(10):1161-208.
  51. Schroeder WH, Dobson M, Kane DM, Johnson ND. Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: a review. *Japca*. 1987;37(11):1267-85.
  52. Ferraro SA, Yakisich JS, Gallo FT, Tasat DR. Simvastatin pretreatment prevents ambient particle-induced lung injury in mice. *Inhalation toxicology*. 2011;23(14):889-96. doi: 10.3109/08958378.2011.623195.
  53. Dreher K, Jaskot R, Kodavanti U, Lehmann J, Winsett D, Costa D. Soluble transition metals mediate the acute pulmonary injury and airway hyperreactivity induced by residual oil fly ash particles. *Chest*. 1996;109(3 Suppl):33S-4S.
  54. Cozzi E, Hazarika S, Stallings HW, 3rd, Cascio WE, Devlin RB, Lust RM, et al. Ultrafine particulate matter exposure augments ischemia-reperfusion injury in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;291(2):H894-903. doi: 10.1152/ajpheart.01362.2005.
  55. Kim JB, Kim C, Choi E, Park S, Park H, Pak HN, et al. Particulate air pollution induces arrhythmia via oxidative stress and calcium calmodulin kinase II activation. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;259(1):66-73. doi: 10.1016/j.taap.2011.12.007.
  56. MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM<sub>10</sub> and ultrafine particles with special reference to COPD. *The European respiratory journal Supplement*. 2003;40:47s-51s.
  57. Brook RD. You are what you breathe: evidence linking air pollution and blood pressure. *Current hypertension reports*. 2005;7(6):427-34.
  58. Yu M, Zheng X, Witschi H, Pinkerton KE. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002;68(2):488-97.
  59. Minuk GY. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 1998;12(6):417-21.
  60. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*. 2014;147(4):765-83 e4. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.018.
  61. Pan WC, Wu CD, Chen MJ, Huang YT, Chen CJ, Su HJ, et al. Fine Particle Pollution, Alanine Transaminase, and Liver Cancer: A Taiwanese Prospective Cohort Study (REVEAL-HBV). *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(3). doi: 10.1093/jnci/djv341.

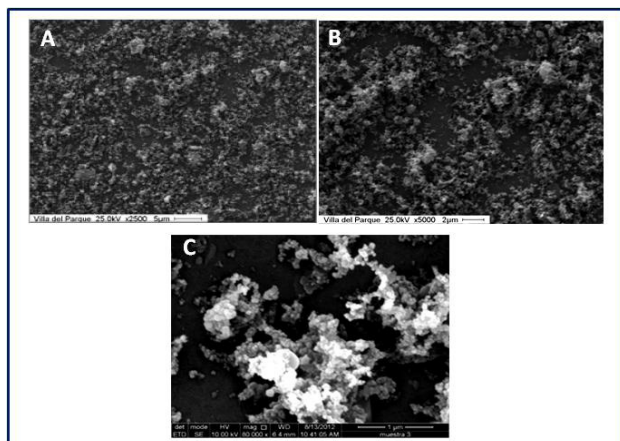
**Figuras Complementarias**

**Tabla 1 sup.** Perfil lipídico sérico de ratones jóvenes controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.

Perfil lipídico (mg/dl)			
	Col Tot	C-HDL	TG
Control	139,0±32,8	87,8±15,7	214,6±46,9
ROFA <sub>3h</sub>	123,7±24,1	88,8±13,8	126,6±31,3
UAP-BA <sub>3h</sub>	127,0±12,3	94,0±1,5	122,0±1,0
ROFA <sub>24h</sub>	138,3±4,2	95,7±10,2	152,7±44,3
UAP-BA <sub>24h</sub>	153,3±16,1	104,7±2,5	183,7±75,9
ROFA <sub>48h</sub>	106,0±22,8	78,0±5,8	148,8± 20,9
UAP-BA <sub>48h</sub>	106,4±12,1	88,0±11,3	199,2±32,2

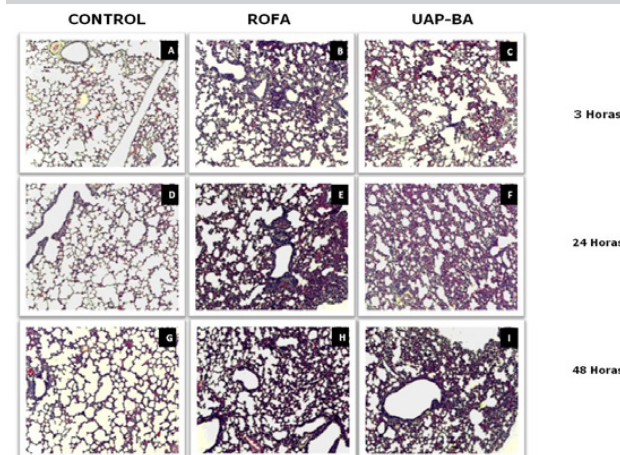
► Los valores representan las medias ± SD.

**Figura 1 sup.** Análisis morfológico de UAP-BA. Microscopía electrónica de Barrido (MEB) de UsuAP-BA.



► A). Mag. Orig. 2500X. B) Mag. Orig. 5000X. y C) Mag. Orig 80000X.

**Figura 3 sup.** Microfotografías del tracto respiratorio inferior de ratones jóvenes controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



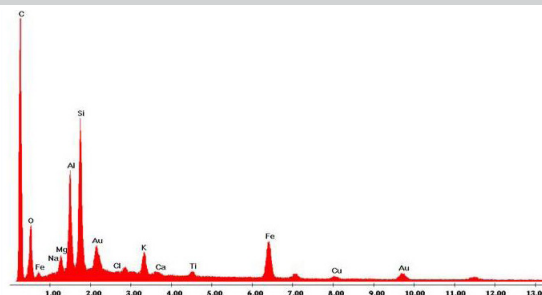
► Coloración H&E. Ori. Mag. 100X. Nótese el aumento de infiltrado de células inflamatorias para ambas partículas ambientales aéreas en todos los tiempos ensayados.

**Tabla sup 2.** Perfil lipídico sérico de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.

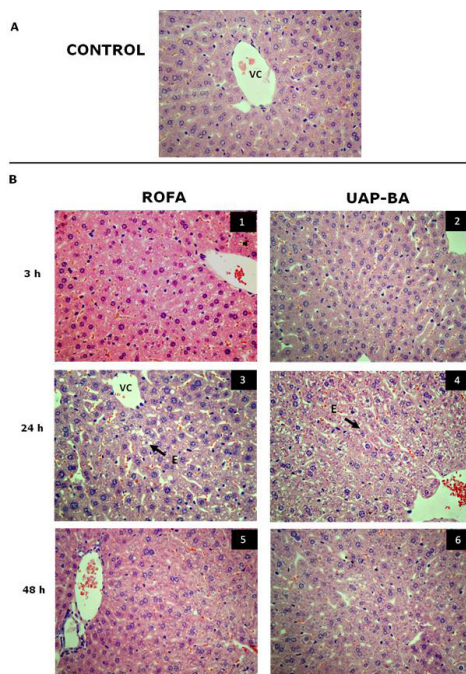
Perfil lipídico (mg/dl)			
	Col Tot	C-HDL	TG
Control	100,4±19,6	82,8±16,9	198,2±56,9
ROFA <sub>3h</sub>	112,0±24,2	97,5±21,4	193,0±9,2
UAP-BA <sub>3h</sub>	104,0±16,2	92,0±11,5	150,5±28,3
ROFA <sub>24h</sub>	117,8±17,8	91,5±18,5	155,0±44,9
UAP-BA <sub>24h</sub>	97,2±12,9	72,7±6,6	196,5±70,1
ROFA <sub>48h</sub>	85,0±10,3	76,0±0,1	113,0± 8,8
UAP-BA <sub>48h</sub>	109,5±3,5	83,0±2,3	93,5±30,4

► Los valores representan las medias ± SD.

**Figura 2 sup.** Análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) de las partículas aéreas de Buenos Aires (UAP-BA).



**Figura 4 sup.** Microfotografías de hígados de ratones jóvenes controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► A: control. B expuestos a las partículas. Ambos tipos de partículas provocaron esteatosis (E). Vena Central (VC). Mag Orig. 400X

# CURSOS ABA

## ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

### CICLO LECTIVO 2018

#### PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA

##### Informes e inscripción

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina

Venezuela 1823 Piso 3 (1096) – Buenos Aires -Argentina

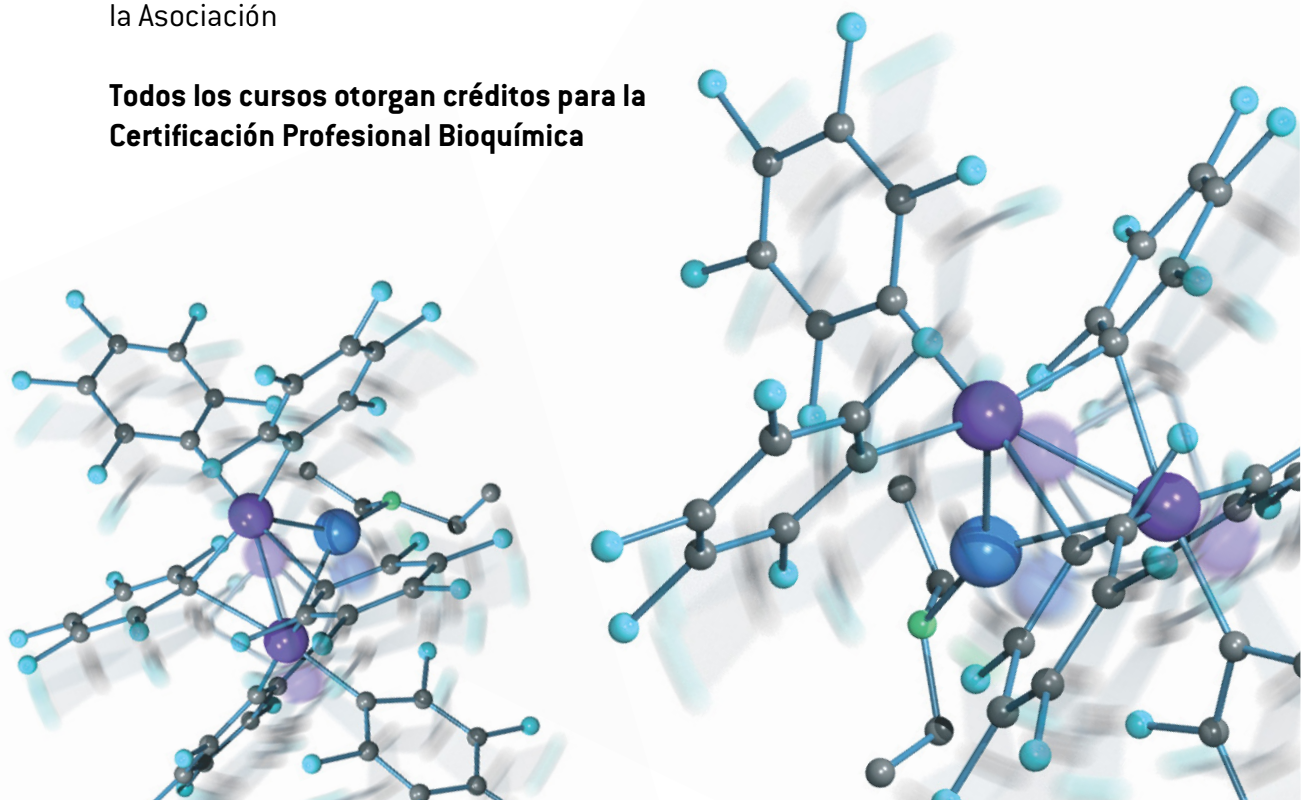
Tel: (011) 4381-2907 Telefax: (011) 4384-7415 - De 15 a 19 Hs.

**Consultas administrativas:** [cursos@aba-online.org.ar](mailto: cursos@aba-online.org.ar)

**Programas completos disponibles en:** <http://www.aba-online.org.ar/>

**Nota para no socios:** abonando la primera cuota social y adhiriendo al débito automático por tarjeta, podrá acceder a los cursos ABA como socio, recibiendo además todos los beneficios de la Asociación

**Todos los cursos otorgan créditos para la Certificación Profesional Bioquímica**



# PROGRAMA DE EDUCACION CONTINUA ABA 2018. Anuncio de cursos

Nota: Los programas de los cursos estarán publicados en la página Web a partir del 20 Febrero 2018

NOMBRE DEL CURSO		FECHA DE INICIO	DURACION	DIRECTOR/ES
1	INMUNOLOGÍA CLÍNICA (Nuevo)	A definir	ANUAL	Dr. Fernando Chirido Dr. Orlando Gabriel Carballo
2	CURSO ANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA - VERSIÓN 2018	2 de abril	ANUAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
3	EVALUACIÓN DE LA PAREJA INFERTIL - "ROL BIOQUÍMICO EN EL LABORATORIO"	9 de aril	ANUAL c/15 días	Dr. Eduardo Mormandi Dra. Patricia Otero
4	EL LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. Actualización de los procedimientos de diagnóstico. (Nuevo)	16 de abril	ANUAL 1 módulo p/mes 2 clases p/módulo	Dra. Patricia Otero
5	CURSO GASES EN SANGRE Y MEDIO INTERNO	23 de abril	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia B. González
6	PRINCIPIOS BÁSICOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS DE HEMOSTASIA (Nuevo)	23 de abril	CUATRIMESTRAL	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq Dra. Marta Martinuzzo
7	DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINOPATÍAS A PARTIR DE CASOS CLÍNICOS	23 de abril	CUATRIMESTRAL	Dra. Mónica Aixalá Dra. Silvia B. González
8	INFECCIONES SEVERAS, AGENTES MULTIRRESISTENTES Y SU POSIBLE ABORDAJE - 2018	8 de mayo	ANUAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
9	BIOQUÍMICA FORENSE "EL ROL DEL BIOQUÍMICO FORENSE EN LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL	30 de abril	CUATRIMESTRAL c/ 15 días	Dr. Christian Jaroszewski
10	EL LABORATORIO CLÍNICO EN PEDIATRÍA	7 de mayo	SEMESTRAL	Dra. Sandra Ayuso Dra. Viviana Osta
11	CURSO INTEGRAL SOBRE LÍQUIDOS DE PUNCIÓN	7 de mayo	BIMESTRAL	Dr. Luis Palaoro
12	AUTOMATIZACIÓN E INTERFERENCIAS EN LOS RESULTADOS HEMATOLÓGICOS SU INTERPRETACIÓN A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE CASOS	14 de mayo	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
13	INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS II	21 de mayo	SEMESTRAL	Dr. Luis Bastos Dra. María de la Paz Domínguez
14	TÓPICOS DE HEMATOLOGÍA EN EL NEONATO. CASOS CLÍNICOS	4 de junio	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
15	FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA y ANALÍTICA (Nuevo)	5 de junio	SEMESTRAL	Dra. Gloria Alvarez
16	ACTUALIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE DISPROTEINEMIAS Y HEMOGLOBINOPATÍAS (Nuevo)	25 de junio	SEMESTRAL	Dra. Raquel Osatinskyra Dra. Isabel Desimone Dra. Isabel Crispiani
17	INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS I	2 de julio	SEMESTRAL	Dr. Luis Bastos Dra. María de la Paz Domínguez
18	PATOLOGÍAS POCO FRECUENTES Y SU DIAGNÓSTICO A TRAVÉS DEL FROTIS	9 de julio	CUATRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
19	APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA CURSO POR CONVENIO: ABA- GRFC	16-Jul	CUATRIMESTRAL	Dra. Viviana Novoa Dra. Emilse Bermejo
20	CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS. ¿CÓMO Y QUÉ INFORMAR? (Nuevo)	16 de julio	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
21	SALUD FETAL. "Herramientas no- invasivas para el screening y detección de aneuploidias y preeclampsia. Una puesta al día"	21 de agosto	CUATRIMESTRAL	Dra. Patricia Maidana
22	TÓPICOS EN EMERGENTOLOGÍA: Sepsis y Biomarcadores (Nuevo)	Segundo semestre	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia Gonzalez
23	ESTUDIO DE ENFERMEDADES HEMORRAGÍPARAS (Nuevo)	Segundo semestre	A DEFINIR	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq Dra. Marta Martinuzzo
24	EI BIOQUÍMICO EN EL BANCO DE SANGRE (Nuevo)	Segundo semestre	SEMESTRAL	Dr. Jorge Rey
25	LOS CURSOS DE CALIDAD ANALÍTICA SE DICTAN EN LA PLATAFORMA GMIGLIARINO CONSULTORES CON 20% DE DESCUENTO PARA SOCIOS ABA	Visite la WEB de ABA	TODO EL AÑO	Dr. Gabriel Migliarino

## SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION  
BIOQUIMICA  
ARGENTINA



### ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA

Fundada el 3 de septiembre de 1934

#### Miembro Fundador:

*Confederación Unificada Bioquímica de la Republica Argentina (CUBRA); Coordinadora de Colegios Bioquímicos de Ley de la República Argentina; Sociedad de Bioquímica y Patología Clínica del MERCOSUR.*

#### Institución Invitada:

*Ente Coordinador de Unidades Académicas de Facultades de Farmacia y Bioquímica (ECUAFyB.)*

#### Miembro Adherente:

*Asociación Latinoamericana Patología Clínica.*

#### Integrante:

*Comisión Nacional de Certificación Bioquímica (COCERBIN); Comisión de Elaboración de Normas y Guías de Laboratorio del Ministerio de Salud y Acción Social; Consejo Asesor y del Comité de Auditoría Interna Programa de Acreditación de Laboratorios de la Fundación Bioquímica Argentina.*

La ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA es la primera entidad Bioquímica de nuestro país, y la precursora de muchas otras en Latinoamérica.

#### Los objetivos que llevaron a su creación, siguen vigentes en la actualidad:

- 1 | Promover la educación continua de los bioquímicos.
- 2 | Editar la Revista Bioquímica y Patología Clínica, que es la revista científica de la Asociación, de distribución cuatrimestral.
- 3 | Desarrollar cursos de capacitación y actualización, en la Ciudad de Buenos Aires y el Interior del País.
- 4 | Cada 2 años, organiza en los años pares el Congreso Nacional Bioquímico y en los años impares, las Jornadas de Actualización ABA.
- 5 | En su sede tiene un aula docente de 30 asientos y un moderno laboratorio de trabajos prácticos.
- 6 | Asimismo, la Asociación ha implementado el Programa de Certificación Bioquímica, mediante el cual se puede acceder a los Certificados de Especialista, y de Actualización en una determinada especialidad o en Bioquímica Clínica.
- 7 | En la Asociación funcionan además, diferentes Comisiones Internas y las Divisiones / Secciones, encabezadas por prestigiosos profesionales, para asesorar a la Comisión Directiva y a sus socios.
- 8 | La ABA tiene convenios de cooperación institucional con universidades nacionales, privadas y fundaciones científicas de prestigio.

Los socios de la ABA gozan de aranceles preferenciales en cualquier actividad que desarrolla la Institución y reciben la Revista ByPC sin cargo adicional.

## SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION  
BIOQUIMICA  
ARGENTINA



Para asociarse, debe hacernos llegar esta solicitud completa en letra clara de imprenta y sin omitir ningún dato. Adjuntar una foto carnet, una fotocopia del título (anverso y reverso, tamaño 10 x 15 cm.) y -de elegir este sistema de pago- el formulario de ingreso al sistema de débito automático por tarjeta de crédito VISA o MASTERCARD (\$45/mes). En su defecto deberá abonar un año por adelantado (\$540/año)

En el caso que usted optara por el pago anual, puede hacerlo en efectivo en nuestra secretaría o mediante cheque y/o giro postal a la orden de "Asociación Bioquímica Argentina", completo, sin abreviaturas.

Apellido y Nombre .....

D.N.I. – L.C. – L.E. – C.I. ....

Fecha de Nacimiento .....

Domicilio .....

Localidad ..... C.P. ....

Provincia ..... País .....

Teléfono ..... e-mail .....

Título profesional ..... Otorgado por .....

Año ..... Nro. Matrícula .....

Lugar de trabajo .....

Domicilio .....

Teléfono ..... e-mail .....

### INFORMES

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina Venezuela 1823 Piso 3  
1096 – Ciudad de Buenos Aires. e-mail: info@aba-online.org.ar.  
TELEFAX (011)4384-7415 - TEL: (011) 4381-2907

Horario: Lunes a Viernes de 15:00 a 19:00 Hs.

# Dengue - Zika Chikungunya

---

**BIO-RAD**

## Dengue

- **Platelia Dengue NS1Ag**  
ELISA x 96 tests
- **Dengue NS1Ag strip**  
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests



- **MultiSure Dengue IgG, IgA, IgM y NS1Ag**  
Inmunocromatografía – Test Rápido x 20 tests



- **Dengue IgG**  
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM**  
ELISA x 96 tests
- **Dengue IgM captura**  
ELISA x 96 tests

---

## Zika



- **Zika IgM Captura**  
ELISA x 96 tests



- **DPP Zika IgM /IgG**  
Inmunocromatografía – Test Rápido x 25 tests

---

## Chikungunya



- **Chikungunya IgG**  
ELISA x 96 tests
- **Chikungunya IgM Captura**  
ELISA x 96 tests



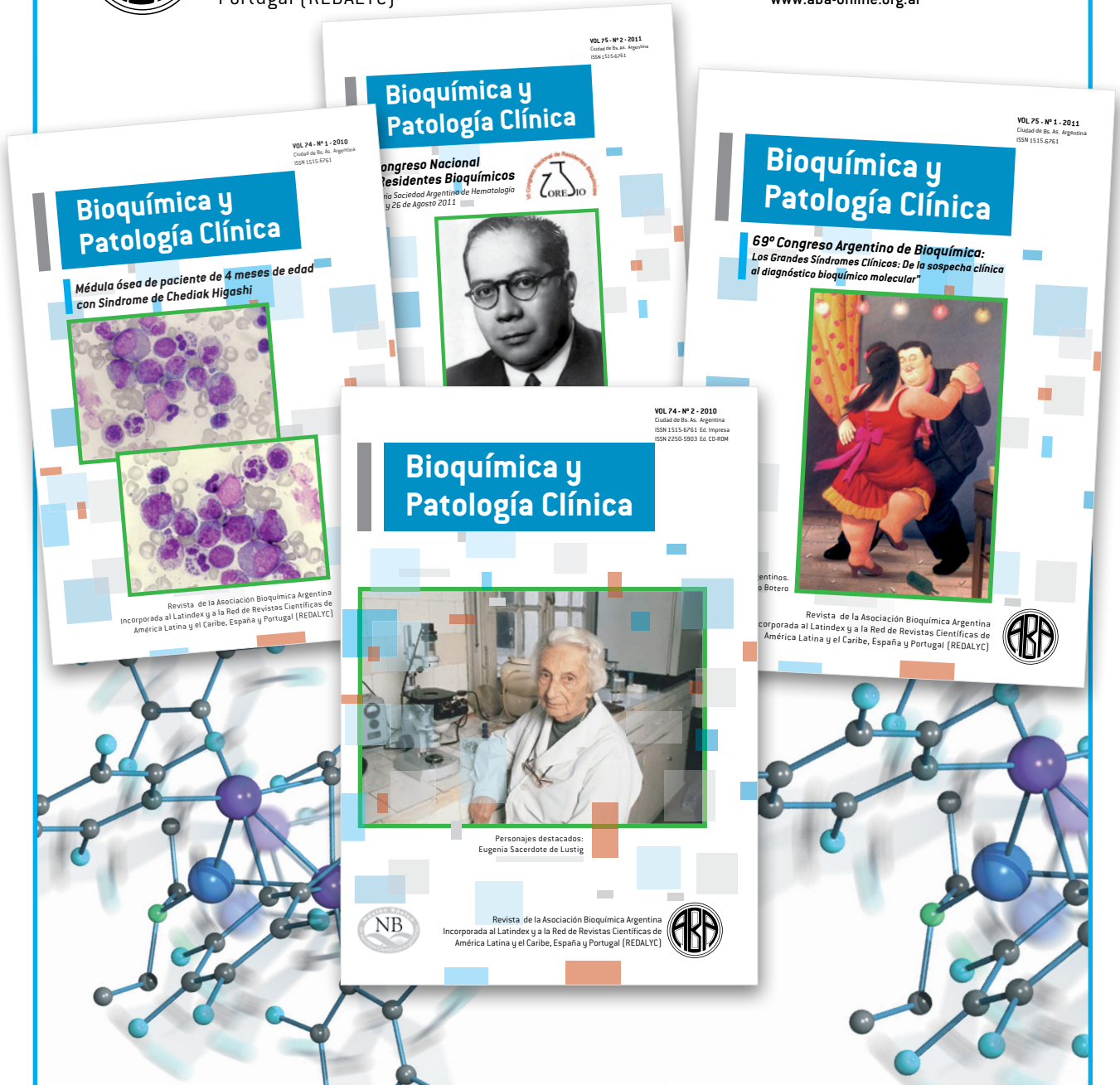
# Anuncie en ByPC...

# Bioquímica y Patología Clínica



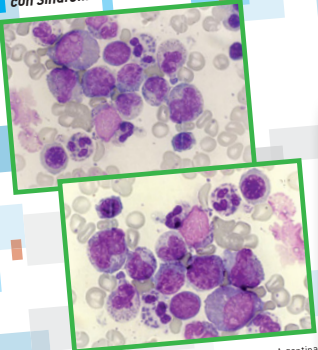
Revista de la Asociación Bioquímica Argentina  
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)  
Buenos Aires - Argentina  
Tel/ fax: 4384-7415 - Tel: 4381-2907  
e-mail: info@aba-online.org.ar  
www.aba-online.org.ar



## Bioquímica y Patología Clínica

Médula ósea de paciente de 4 meses de edad con Síndrome de Chediak Higashi



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina  
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

## Bioquímica y Patología Clínica

Congreso Nacional Residentes Bioquímicos  
Sociedad Argentina de Hematología y 26 de Agosto 2011



## Bioquímica y Patología Clínica



Personajes destacados:  
Eugenia Sacerdote de Lustig



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina  
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)



## Bioquímica y Patología Clínica

69° Congreso Argentino de Bioquímica:  
Los Grandes Síndromes Clínicos: De la sospecha clínica al diagnóstico bioquímico molecular



Personajes destacados:  
D. Bótero

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina  
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)



# MicroScan



## Microbiología Automatizada

### Identificación y Sensibilidad

MicroScan responde a las necesidades de atención eficaz de los pacientes mediante resultados automatizados rápidos de ID/AST sin reducir la exactitud.



WalkAway 40 Plus



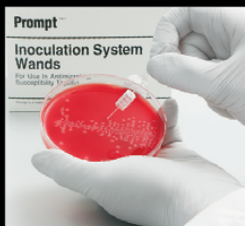
WalkAway 96 Plus



autoSCAN4

### Sistemas MicroScan

La línea se completa con múltiples opciones de paneles que han sido adaptados a la epidemiología local, de tipo Combo (ID/AST), solo CIM y solo identificación. También Paneles para identificación de levaduras, anaerobios y fastidiosos y Paneles especiales para sensibilidad de Microorganismos exigentes.



#### Selección de colonias con PROMPT

Estandarización de inóculos sin pérdida de tiempo por turbidez gracias al sistema de inoculación PROMPT™.



#### Preparación de inóculos con PROMPT

La estabilidad del inóculo de hasta cuatro horas flexibiliza el flujo de trabajo.



#### Inoculación de panel con RENOK

La inoculación simultánea de los 96 pocillos del panel simplifica el flujo de trabajo.

### LabPro Software Suite

La mejora de la gestión de datos con el conjunto de aplicaciones de LabPro promueve la eficacia en el laboratorio al agilizar al flujo de trabajo y facilitar el acceso a la información del paciente. LabPro Manager, LabPro Alert y LabPro Connect en forma conjunta, le ayudan a estandarizar y consolidar las pruebas, adaptar la creación versátil de informes de resultados y aumentar su capacidad para identificar la emergencia de nuevas resistencias.



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar