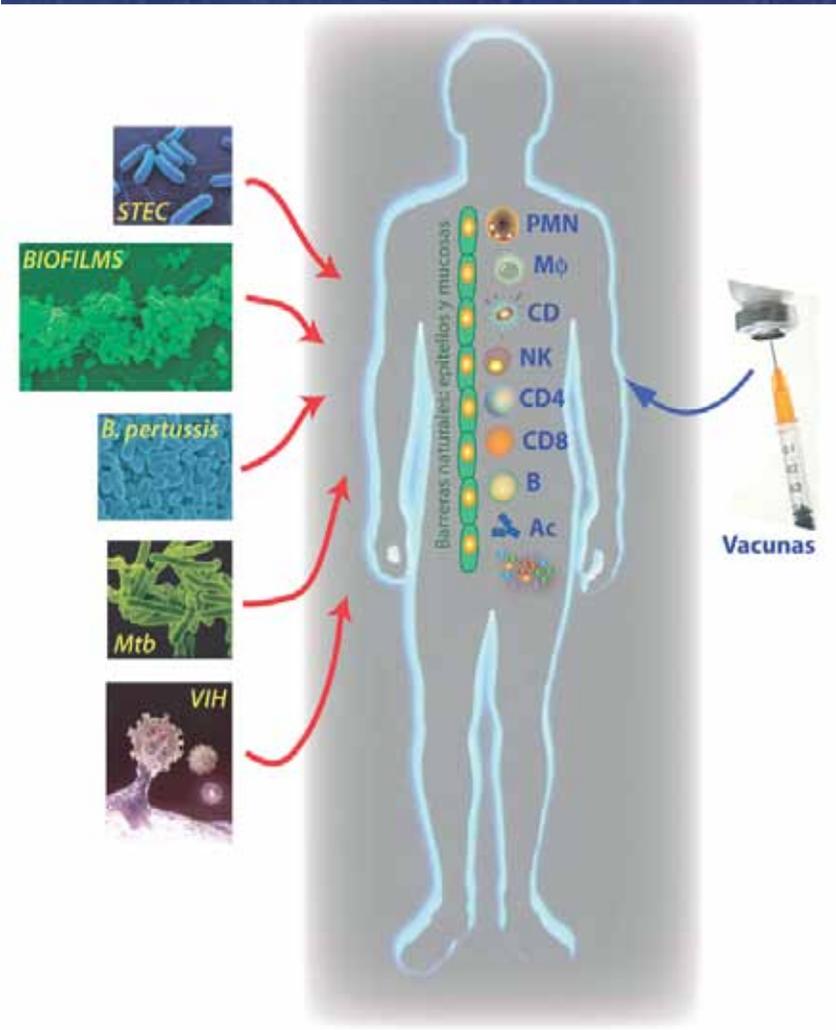


Ciencia e Investigación Divulgación

CI
Divulgación

Primera revista argentina de información científica / Fundada en enero de 1945



PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

■ Abrey-Recalde, M.J., Cabrera, G., Fernández-Brando R.J., Mejías, M.P., Palermo, M.S., Panek, C.A. y Ramos, M.V.

INFECCIONES OCASIONADAS POR BIOFILMS BACTERIANOS. CAUSAS DE SU DIFICULTAD PARA ERRADICARLAS

■ María Laura Gabelloni, Florencia Sabbione y Analía Trevani

TUBERCULOSIS, UNA ENFERMEDAD CUYA FISIOPATOLOGÍA DEPENDE DE UNA INTRINCADA RELACIÓN ENTRE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL HOSPEDADOR Y EL AGENTE CAUSAL

■ María Del Carmen Sasiain, Oscar Bottasso y Verónica García

INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS EN LA ARGENTINA. UNA PUESTA AL DÍA

■ Liliana Bezrodnik

BREVE HISTORIA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA Y ALGUNAS PROPUESTAS PARA EL FUTURO

■ Martín A. Isturiz

BORDETELLA PERTUSSIS, UN PATÓGENO HUMANO QUE HA SOBREVIVIDO A DÉCADAS DE VACUNACIÓN MASIVA

■ María Eugenia Rodríguez

TRANSMISIÓN SEXUAL DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV-1): PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

■ Juan Sabatté, Ezequiel Dantas, Antonela Merlotti, Heidi González, Pehuén Pereyra, Natalia Sio, Ana Ceballos, Mercedes Cabrini, Jorge Geffner

COMPROMISO

con el bienestar de todos

HACEMOS
ENERGÍA
NUCLEAR



NUCLEOELÉCTRICA ARGENTINA S.A.

ATUCHA I / ATUCHA II / EMBALSE

Despejá tus dudas sobre la energía nuclear en: www.na-sa.com.ar



Ministerio de
Planificación Federal,
Inversión Pública y Servicios
Presidencia de la Nación

EDITOR RESPONSABLE

Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC)

COMITÉ EDITORIAL

Editora

Dra. Nidia Basso

Editores asociados

Dr. Gerardo Castro

Dra. Lidia Herrera

Dr. Roberto Mercader

Dra. Alicia Sarce

Dr. Juan R. de Xammar Oro

Dr. Norberto Zwirner

CIENCIA E

INVESTIGACIÓN

Primera Revista Argentina de información científica.

Fundada en Enero de 1945.

Es el órgano oficial de difusión de La Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias.

A partir de 2012 se publica en dos series, Ciencia e Investigación Divulgación y Reseñas de Ciencia e Investigación

Av. Alvear 1711, 4° piso,
(C1014AAE) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Teléfono: (+54) (11) 4811-2998
Registro Nacional de la Propiedad Intelectual
N° 82.657. ISSN-0009-6733.

Lo expresado por los autores o anunciantes, en los artículos o en los avisos publicados es de exclusiva responsabilidad de los mismos.

Ciencia e Investigación se edita on line en la página web de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC)
www.aargentinapciencias.org

Nuestra portada: Nuestro sistema inmune ha desarrollado una compleja red de interacciones entre leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos (Mφ), células dendríticas (CD), células citotóxicas naturales (NK), linfocitos T CD4 (CD4) y CD8 (CD8), y linfocitos B (B) con el fin de eliminar patógenos invasores a través de la producción de anticuerpos (Ac), mediadores solubles y células citotóxicas. Además, el sistema inmune "registra" al patógeno generando memoria inmunológica, lo que nos permite erradicar infecciones subsiguientes con el mismo agente patógeno antes de que se establezca la enfermedad. Esta memoria inmunológica es deliberadamente inducida en el ser humano a través de las vacunaciones. No obstante, algunos patógenos persisten en el huésped y desarrollan infecciones crónicas o a repetición.



SUMARIO

EDITORIAL

La inmunología en Argentina. Una rama de las ciencias biomédicas que contribuye al mejoramiento de la salud de la población.

Norberto W. Zwirner 3

Reflexiones sobre el papel de la AAPC en la actualidad, y sobre la actualidad de la política científica.....5

ARTÍCULOS

Breve historia de la Sociedad Argentina de Inmunología y algunas propuestas para el futuro.

Martín A. Isturiz 6

Participación de la Respuesta Inmune en el Desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico.

Abrey-Recalde, MJ; Cabrera, G; Fernández-Brando RJ; Mejías, MP; Palermo, MS; Panek CA; Ramos, MV. 11

Infecciones ocasionadas por biofilms bacterianos. Causas de su dificultad para erradicarlas.

María Laura Gabelloni, Florencia Sabbione y Analía Trevani 21

Bordetella pertussis, un patógeno humano que ha sobrevivido a décadas de vacunación masiva.

María Eugenia Rodríguez 31

Tuberculosis, una enfermedad cuya fisiopatología depende de una intrincada relación entre los mecanismos de resistencia del hospedador y el agente causal.

María del Carmen Sasiain, Oscar Bottasso, Verónica García 40

Inmunodeficiencias Primarias en la Argentina. Una puesta al día.

Liliana Bezrodnik 58

Transmisión sexual del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1): papel de las células dendríticas.

Juan Sabatté, Ezequiel Dantas, Antonela Merlotti, Heidi González, Pehuén Pereyra, Natalia Sio, Ana Ceballos, Mercedes Cabrini, Jorge Geffner. 68

INSTRUCCIONES PARA AUTORES 77

... La revista aspira a ser un vínculo de unión entre los trabajadores científicos que cultivan disciplinas diversas y órgano de expresión de todos aquellos que sientan la inquietud del progreso científico y de su aplicación para el bien.

Bernardo A. Houssay

Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias

COLEGIADO DIRECTIVO

Presidente
Dr. Miguel Ángel Blesa

Vicepresidente
Ing. Arturo J. Martínez

Secretaria
Dra. Alicia Sarce

Tesorero
Dr. Horacio H. Camacho

Protesorero
Dr. Carlos Alberto Rinaldi

Presidentes Anteriores
Dra. Nidia Basso
Dr. Alberto C. Taquini (h)

Presidente Honorario
Dr. Horacio H. Camacho

Miembros Titulares
Ing. Juan Carlos Almagro
Dr. Alberto Baldi
Dr. Máximo Barón
Dr. Eduardo H. Charreau
Dra. Dora Alicia Gutiérrez
Ing. Oscar Mazzantini
Dr. Marcelo Vernengo
Dr. Juan R. de Xammar Oro

Miembros Institucionales
Sociedad Argentina de Cardiología
Sociedad Argentina de Farmacología Experimental
Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial
Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica
Sociedad Argentina de Investigación Clínica
Unión Matemática Argentina

Miembros Fundadores
Dr. Bernardo A. Houssay – Dr. Juan Bacigalupo – Ing. Enrique Butty
Dr. Horacio Damianovich – Dr. Venancio Deulofeu – Dr. Pedro J. Elizalde
Ing. Lorenzo Parodi – Sr. Carlos A. Silva – Dr. Alfredo Sordelli – Dr. Juan C. Vignaux – Dr.
Adolfo T. Williams – Dr. Enrique V. Zappi

AAPC
Avenida Alvear 1711 – 6° Piso
(C1014AAE) Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina
www.aargentinapciencias.org

La inmunología en Argentina. Una rama de las ciencias biomédicas que contribuye al mejoramiento de la salud de la población.

Norberto W. Zwirner ■

Investigador Independiente CONICET
Laboratorio de Inmunopatología
Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME)
Vuelta de Obligado 2490
C1429ADN Ciudad Autónoma de Buenos Aires
nzwirner@ibyme.conicet.gov.ar

A principios de este año, recibí la invitación de las autoridades de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias para organizar un número especial de la revista “Ciencia e Investigación” referido a Inmunología, por lo que quiero comenzar este editorial agradeciendo a las autoridades por el honor que me han concedido. Cuando comencé a bosquejar el número dedicado a esta pujante y revolucionaria rama de las ciencias biomédicas, me encontré con la necesidad de tomar decisiones difíciles. Mi idea fue armar un número en el cual se muestre a la comunidad de lectores el aporte de la inmunología a la resolución de problemas concretos en nuestra sociedad, aspecto que es importante no perder de vista. Sin embargo, a poco de comenzar me encontré con que la lista de posibles temas y autores era demasiado extensa como para abarcar un único número de la revista. Por lo tanto, me vi en la necesidad de escoger sólo algunos para este primer número de la revista. Así, seleccioné una serie de artículos relacionados con la inmunidad contra agentes infecciosos en los que los autores además describen de qué manera algunas de las investigaciones realizadas en nuestro país constituyen aportes importantes para un mejor conocimiento de problemas que afectan a la salud de nuestra población. En este contexto, me pareció oportuno contar con un artículo donde se aborde la problemática del síndrome urémico hemolítico y para ello contamos con el aporte del grupo liderado por la Dra. Marina Palermo, quien se desempeña como actual Presidente de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI) y en el que se describen algunos problemas relacionados con la transmisión, patogénesis y tratamiento de esta enfermedad que de tanto en tanto se presenta en nuestra sociedad y provoca casos fatales. Otro aspecto importante desde el punto de vista biomédico lo constituye el desafío de combatir las infecciones bacterianas que se establecen en forma de biofilms y para ello contamos con el aporte de la Dra. Analía Trevani y sus colaboradores. En este artículo se describen los conocimientos actuales sobre los biofilms y los desafíos que representan en salud humana. Otro aspecto importante en nuestra sociedad es la re-emergencia de enfermedades que se creían controladas, para lo cual contamos con dos artículos. En uno de ellos, la Dra. María Eugenia Rodríguez describe la problemática referida a la re-emergencia de la tos convulsa, los problemas asociados a las vacunas existentes y los desafíos en este campo. En el otro artículo, los Dres. Oscar Bottasso, María del Carmen Sasiain y Verónica García abordan la temática de la re-emergencia de la tuberculosis y la multi-resistencia a drogas.

No podían estar ausentes los artículos referidos a las inmunodeficiencias y para ello, contamos con el aporte de la Dra. Liliana Bezrodnik, quien describe la importancia de la realización de estudios médicos cuidadosos en pacientes que cursan con infecciones recurrentes que podrían ser indicio de la presencia de una inmunodeficiencia primaria que en ciertas ocasiones pasa desapercibida y lleva al paciente a tratamientos y hospitalizaciones repetidas. En el artículo restante contamos con el aporte del Dr. Jorge Geffner y sus colaboradores, quienes abordan algunos aspectos referidos al papel de las mucosas en el proceso de infección y transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Asimismo, me pareció oportuno comenzar este número especial con un artículo que reseñe algunos hitos de la historia de la SAI y de opinión sobre política científica para lo cual contamos con el aporte del Dr. Martín Isturiz. Limitaciones de espacio me impidieron convocar a más socios de la SAI, por lo cual pido disculpas. No obstante, quisiera destacar que las investigaciones que realizan los miembros de la sociedad en nuestro país, en una u otra medida, tienen un importante impacto en el mejoramiento de la salud de nuestra población al abordar problemas que nos afectan directa o indirectamente. Por ello, es necesario profundizar el apoyo de parte de las autoridades políticas (nacionales, provinciales, universitarias, etc.) mediante el otorgamiento de subsidios competitivos. Coincidente con este número especial de "Ciencia e Investigación", este año la SAI cumple 40 años de existencia y se celebrará en el mes de noviembre, la 60ª reunión científica. Quisiera que este número de la revista constituya un humilde reconocimiento hacia cada uno de los investigadores básicos y clínicos que comenzaron con el "Club de Inmunología" allá por la década del '70 y luego generaron esta sociedad científica tan pujante. Y también es mi deseo que el conjunto de artículos que los lectores encontrarán en las páginas siguientes sirva para difundir entre la comunidad científica argentina las actividades que desarrollamos quienes integramos orgullosamente la Sociedad Argentina de Inmunología. Muchas gracias.

Reflexiones sobre el papel de la AAPC en la actualidad, y sobre la actualidad de la política científica

El interesante artículo de Martín A. Isturiz (Isturiz M. Ciencia e Investigación 62(2): 6, 2012.) plantea en su última parte temas que van más allá de la divulgación científica propiamente dicha.

Su contenido nos induce a difundir las reflexiones que venimos haciendo desde hace algún tiempo respecto al papel de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias, las interrelaciones con las administraciones de los diversos sectores de la Ciencia y la Técnica. También queremos difundir algunas de las acciones concretas que hemos encarado en este contexto.

Cuando nació, la AAPC era una organización que cumplía roles que actualmente corresponden a CONICET y a MINCyT; por ejemplo, otorgamiento de becas y subsidios. En esta concepción, el Colegiado Directivo era un verdadero Directorio en la obtención y administración de fondos públicos y privados aplicados al desarrollo de la ciencia. Esta función ya se ha modificado. En la actualidad, está alentando a todos los científicos y tecnólogos a incorporarse activamente en proyectos y tareas orientadas hacia las acciones de promoción de la ciencia y la tecnología, en un marco en el que existe una importante cantidad de asociaciones disciplinares, muchas de ellas puramente académicas. En ese contexto, la AAPC está comen-

zando a llevar adelante un programa de encuentros interdisciplinares, con participación de autoridades de dos o más asociaciones disciplinares. La idea es discutir en esos encuentros no sólo las características de las fronteras del conocimiento en el cruce entre disciplinas, sino también las propuestas organizativas para atender la decreciente importancia de los bordes entre disciplinas. Por ejemplo, ¿cómo se evalúa en el CONICET a las interdisciplinas? ¿qué acciones concretas fomentarán su desarrollo? Lógicamente, estas reflexiones no son de utilidad si no son recibidas adecuadamente por los sectores de la administración científico-tecnológica. Afortunadamente, estas acciones, conversadas con el Sr. Ministro de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva recibieron un franco apoyo.

Creemos que la AAPC es un vehículo muy apto para encarar gestiones ante las autoridades para resolver temas de importancia para nuestro sector. En el caso concreto de MINCyT y CONICET, la recepción ha sido excelente, y creemos no equivocarnos al decir que la gran mayoría de los integrantes de nuestro sector tienen una visión altamente positiva de la gestión de las actuales autoridades del MINCyT, valoración que está al margen de las ideas y preferencias políticas de cada uno.

No escapa a nuestra visión que las extremas fluctuaciones políticas que tuvieron lugar en nuestro país desde la creación de la AAPC tuvieron su correlato en extremas fluctuaciones en los criterios para con la Ciencia y la Tecnología. Es por ese motivo que una organización no oficial (una ONG, como se da en llamar a las Asociaciones Civiles) debe tener presencia y continuidad para garantizar que nuestras voces sean escuchadas. Para ello, la AAPC debe ser la organización de todos. Estamos promoviendo la organización de Capítulos Regionales de la AAPC en diversos sitios del país, estamos realizando una intensa campaña de conscripción de socios, y, además, estamos reforzando la participación de las asociaciones disciplinares. Según nuestro estatuto, las asociaciones disciplinares asociadas participan con voz y voto en las deliberaciones del Colegiado Directivo. Éste se compone de quince miembros elegidos en asamblea por todos los socios individuales, y de los representantes de las asociaciones disciplinares. Queremos, y podemos, llegar a constituirnos en algo que cumpla el papel de esa Federación de Asociaciones que menciona Isturiz en su artículo. Para ello necesitamos incorporar miembros individuales y asociaciones. En nuestra página web se encuentra el formulario de solicitud de membresía, e invitamos a todos los investigadores activos de la ciencia y la tecnología a asociarse.

Breve historia de la Sociedad Argentina de Inmunología y algunas propuestas para el futuro

■ **Martín A. Isturiz**

Investigador Superior del CONICET,
Instituto de Medicina Experimental,
Academia Nacional de Medicina
(IMEX-CONICET-ANM)

■ UN POCO DE HISTORIA

Habiendo ya algunas referencias históricas claras y formales sobre el origen de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)¹⁻³, la intención de este artículo no es reiterarlas sino dar otro contexto, si se quiere un poco anecdótico, pero que puede ser interesante para tener un panorama sobre los orígenes de la inmunología en nuestro país y la dinámica del desarrollo posterior. Además, esto se complementa con algunas propuestas para el futuro.

En principio considero justo recordar al -casi con seguridad- primer inmunólogo "puro" que tuvo la Argentina. Este fue Carlos Martínez, un médico cordobés que en la década del 40' pasó por el entonces recién fundado Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) y en la década del 50' emigró a Estados Unidos a *The University of Minnesota Medical School*, en donde fue un integrante conspicuo del grupo de Robert A. Good desde 1955 hasta 1966, año en que falleció.

Cabe mencionar que el grupo de Good fue uno de los pioneros a nivel mundial en los estudios acerca de la relevancia del timo en la respuesta inmune y, trabajando esencialmente en trasplantes, fue quien realizó el primer trasplante alogeneico exitoso de médula ósea en el año 1968, tema en el que Martínez tuvo mucho que ver.

Para dar una idea de la importancia de ese grupo cabe mencionar que R. A. Good en la década del 70'-en esa época director del *Sloan-Kettering Institute* de New York- era mencionado como un candidato firme al premio Nobel. Reconocimiento que no consiguió, probablemente, debido al resonante impacto de un fraude científico cometido por uno de sus asistentes (William Summerlin)⁴. El fraude, descubierto en 1974 por otro asistente de Good, lo arrastró, en cierta medida, al desprestigio posterior. Aunque Good, como responsable del laboratorio hizo su *mea culpa* pública, nunca alcanzó a recuperar su imagen previa.

Otros de los inmunólogos pioneros importantes que hubo en nuestro país y que merecen recordarse por su influencia en los inicios de la disciplina -aunque no tuvieron incidencia directa en la formación de la SAI- fueron Osías Stutman y Agustín Dalmaso, del Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari". Sin embargo, a mediados de los 60', primero Dalmaso y luego Stutman también emigraron a EEUU a trabajar al laboratorio de R. A. Good, en donde estaba Martínez. Hacia la misma época, César Milstein que se había instalado en el Instituto Malbrán en 1961, retorna a Inglaterra (en 1962) a estudiar genética de inmunoglobulinas y luego, a mediados de los 70, desarrolla los anticuerpos monoclonales que le significaría -junto a G. Köhler- obtener el Premio Nobel de Medicina 1984.

Para entrar en la historia más ligada al origen real de la SAI es importante mencionar que a mediados de la década del 60 los pocos inmunólogos que había en Argentina se reunían informalmente en un llamado

“Club de Inmunología”, organizado por investigadores de Córdoba (Carlos Yantorno, Clelia Riera), Mendoza (Isaac Rivero), Buenos Aires (Christiane Dosne-Pasqualini, Salvador Blas Zingale, Alois Bachmann, Ricardo Margni, Marta Braun, Jorge Manni, Alicia Mazzoli, Livia Lustig, Emilio Haas, María Estela Roux, Roberto Mancini, Guillermina Feldman, Roberto Arana, Juan Andrada), La Plata (Moisés Spitz, Amada Segal), Rosario (Mauricio Londner, Julio Morini) y -con perdón de algún olvido- no muchos más.

La mayoría de ellos provenían de otras disciplinas como la microbiología, la patología, la reumatología, la endocrinología, la clínica o la oncología, entre otras.

Las razones de la formación de ese “Club de Inmunología” se podrían encontrar en que en esa época, por lo menos en nuestro país, todo lo que se estudiaba en la mayoría de las Universidades argentinas sobre inmunología no pasaba de ser un capítulo de los libros de Microbiología que, habitualmente hablaban de sueros, vacunas, del complemento (sólo hasta el componente C4 y la vía de la properdina) y del fenómeno de Arthus. Y en inmunidad celular se hablaba de linfocitos pequeños, medianos y grandes, de hipersensibilidad retardada y algo del timo, pero no mucho más.

Veníamos un poco retrasados con lo que pasaba en otras partes del mundo y la creación del Club de Inmunología estuvo motivada, entre otras razones, por la necesidad de disponer de un ámbito de actualización en el cual poder discutir trabajos con temáticas afines. Pero también es importante señalar que algunos hitos centrales en el desarrollo posterior de la inmunología eran relativamente recientes.

Así -para situarnos temporalmente- debemos tener en cuenta que la partición de la IgG en los fragmentos Fc y Fab fue hecha por Porter en el año 1958, luego premio Nobel junto a Edelman en 1972 por sus estudios sobre la estructura de las inmunoglobulinas. También en 1958, Nossal y Lederberg demostraron que una célula B produce siempre sólo un anticuerpo, siendo la primera evidencia de certeza de la teoría de la selección clonal, postulada en 1957. La IgE se descubre como el anticuerpo anafiláctico recién en 1966 y la estructura actual con forma de **Y griega** de las inmunoglobulinas es del año 1967, luego de un trabajo de Valentine y Green. Por otra parte, en 1968, Böyum⁵ publicó su famoso método del Ficoll-Hypaque para separar linfocitos, y luego Jondal comenzó a separar linfocitos T de B, mediante la formación de rosetas con eritrocitos ovinos (que se pegaban a los linfocitos T). Para tener una idea del impacto del método de Böyum en el desarrollo posterior de la inmunidad celular, basta recordar que ese trabajo fue el más citado mundialmente en el área de la inmunología durante, por lo menos, una década.

La gran mayoría de los investigadores que formaban ese Club de Inmunología provenían de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), la sociedad madre de la SAI, de la cual hubo un “desprendimiento” por razones temáticas y por la necesidad de compartir y discutir los trabajos que se hacían en el área. Además, la disciplina había empezado a crecer con la aparición de los primeros becarios en el área, entre los que podemos encontrar a María Marta E. de Bracco, Leonardo Fainboim, Silvia Hajos, Luisa Sen, María Elena Estévez, Marta Zelazko, Martín Isturiz, Beatriz Ruibal, María del Carmen Sasiain, Alberto Fossati, Edgardo Carosella, Gabriela Perdi-

gón, Oscar Bottasso, Isabel Piazzon y algunos más que seguramente me olvido.

Luego, sobre la base del Club de Inmunología, en 1972, se funda formalmente la SAI. Su primer presidente fue Alois Bachmann, que trabajaba en la Academia Nacional de Medicina. La vice presidenta era Christiane Dosne-Pasqualini, también de la Academia. Luego, en 1984, se logró la personería jurídica y se realizó el Primer Congreso Argentino de Inmunología, en donde se invitó a participar a inmunólogos latinoamericanos y se fundó la Asociación Latino Americana de Inmunología (ALAI).

Es importante resaltar que, objetivamente, uno de los principales hechos que impulsó la disciplina fue que a mediados de la década del '60, el Dr Ricardo Margni generó un instrumento fundamental para la enseñanza formal de la Inmunología a nivel de grado, creando la primera cátedra de Inmunología en el país -y en América Latina-, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Poco tiempo después, a fines de la década del '60 y en la misma Facultad, Margni creaba la cátedra de Inmunología.

Luego, a principios de la década del '70, las cátedras de inmunología se extendieron a otras universidades como las de Córdoba, La Plata, Rosario y Tucumán, entre otras. Esta penetración de la inmunología en la enseñanza de grado en las Universidades Nacionales tuvo un impacto enorme en la formación de profesionales en el área biomédica y en el suministro de graduados universitarios interesados en este campo de la ciencia. Por otra parte, si uno analiza el árbol genealógico de la SAI podrá entender hoy por qué en esas provincias/regiones hay más desa-

rollo o grupos de investigación en inmunología, que en otras.

Años más tarde, ya en los '70, el Dr Margni complementó su tarea con la escritura del primer libro de texto argentino en inmunología, hecho para estudiantes de grado. Luego, los "libros de Margni" -en sus diferentes ediciones- fueron ampliamente empleados por estudiantes de grado no sólo en universidades argentinas sino también en universidades de Latinoamérica.

Ese grupo pequeño de pioneros locales que formaron el Club de Inmunología seguramente avizoraron que la inmunología ya no era representada cabalmente sólo por las vacunas o por los sueros inmunes, sino que se iba relacionando o integrando dentro de un marco mucho más general de las ciencias biomédicas, y que la fisiología o la fisiopatología de diversas enfermedades tenían componentes de mecanismos inmunológicos "puros" como los fenómenos inflamatorios, las enfermedades autoinmunes en general, la respuesta inmune contra tumores o las inmunodeficiencias primarias, entre otros.

Así, luego de ser una disciplina aislada y/o periférica de la microbiología, la inmunología pasó a estar un poco en el centro de la escena. Esencialmente como sistema integrador de procesos fisiológicos o bioquímicos.

En el área de la inmunología celular, a principios de la década del '70, y como resultado de la aplicación del método de separación en gradientes de Ficoll-Hypaque, se empieza a hablar de una población linfocitaria que no era ni T ni B, luego bautizada como tercera población, o también como linfocitos K (*killer cells*), responsable de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Poco tiem-

po después aparecen en escena las *natural killer cells* (células NK) con sus efectos citotóxicos sobre células tumorales. Luego se comprobó que las células K y las células NK eran la misma población y fueron unificadas bajo la denominación de células NK. También en los '70 aparece el interferón inmune (hoy conocido como interferón gama), las interleuquinas, la restricción en la presentación antigénica por antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y las células T supresoras. Curiosamente, el concepto de las células T supresoras fue abandonado en los '80 debido, principalmente, a la escasa caracterización fenotípica de esas células supresoras y al interés que generó el descubrimiento de muchas sustancias con gran actividad pleiotrópica, las citoquinas. Sin embargo, en años recientes las células T supresoras han resurgido como células clave de la homeostasis de la respuesta inmune que intervienen en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos, aunque, ahora, rebautizadas como células T regulatorias. Lamentablemente faltó un reconocimiento explícito a Richard Gershon, quien a principio de los '70 introdujo el concepto de las células T supresoras, interpretación inicialmente resistida y posteriormente desacreditada por gran parte de la "plana mayor" de los inmunólogos de esa época.

Por otra parte, en la década del '70 Milstein y Köhler crean los anticuerpos monoclonales y se descubren las enzimas de restricción, hechos cardinales que se desarrollan ampliamente a partir de 1980 produciendo un avance cualitativo y cuantitativo impresionante no sólo en inmunología sino en todo el ámbito de las ciencias biomédicas.

Como dato curioso que habla de lo endeble y precario -como todo comienzo- del desarrollo inicial de la inmunología en nuestro país cabe

mencionar que hasta 1981, el Presidente y la Comisión Directiva duraban un año en el cargo, mandato que fue extendido a dos años en 1982. La razón principal de esa decisión fue que, por aquel entonces, no había inmunólogos formados en número suficiente y con alguna trayectoria previa como para ocupar la presidencia de la SAI y cambiar cada año la conducción de la misma. Esta medida duró hasta 1999, año a partir del cual las gestiones al frente de la SAI volvieron a ser de un año gracias a que a partir de entonces ya había suficientes inmunólogos formados.

Desde ese incipiente Club de Inmunología de la década del '60, hoy la SAI está integrada por 215 socios titulares y 211 adherentes.

A partir de ahí, la historia ya es más conocida por todos.

■ POLÍTICAS / CIENCIAS BIOMÉDICAS / TRANSFERENCIA A LA SOCIEDAD

En principio, es importante mencionar que más allá de las formalidades del caso, la SAI en particular y las asociaciones científicas o tecnológicas argentinas en general, no constituyen ámbitos de propuestas políticas para el sector científico-tecnológico argentino ni son referentes de consulta por parte de los responsables de la conducción política del área, como lo es -por ejemplo- la Sociedad Brasileña para el Progreso de las Ciencias, un interlocutor permanente de las políticas llevadas a cabo en ese país.

Una de las razones de estas fallencias se podría encontrar, en parte, en que las conducciones de las sociedades o asociaciones científicas argentinas habitualmente duran entre 1-2 años en su gestión, hecho que no permite tener estructuras con continuidad con algún nivel de ho-

mogeneidad conceptual como para plantearse políticas, aún dentro de las propias instituciones.

Entonces, en ese marco, sólo se dedican al impulso de la disciplina, organizando reuniones, simposios o congresos anuales en donde se discuten resultados con los científicos locales y de otros países, al otorgamiento de becas o a cursos de posgrado. En fin, lo que todos conocemos, las sociedades científicas tienen un perfil estrictamente académico. Obviamente necesario, pero claramente insuficiente.

Sin embargo -y en la medida en que haya interés- esto se podría empezar a resolver generando, por ejemplo, comisiones permanentes *ad hoc* con renovaciones periódicas que trasciendan el período de las autoridades de turno y en donde se podrían fijar o establecer posiciones políticas claras, no sólo en el ámbito de la Inmunología sino de la ciencia y la tecnología en su conjunto. Una posibilidad adicional sería la generación de foros de discusión permanentes acerca de las políticas que se implementan en ciencia y tecnología, ámbito en donde se podrían lograr consensos para analizar rumbos, plantear reorientaciones o acercar propuestas, entre otras cosas.

Más allá de los procedimientos que se quieran o puedan implementar, las sociedades científicas no se deberían limitar a sus campos disciplinares sino que deberían incursionar decididamente en la discusión de los ejes centrales de las políticas científicas y/o tecnológicas a nivel nacional, así como, eventualmente, colaborar en la planificación y en la gestión de las mismas.

Eso sería una manera de tener espacios dinámicos, hoy inexistentes, en donde se podría debatir, sacar conclusiones o tener una presencia más activa en decisiones que afec-

tan no sólo a la inmunología sino a la totalidad del sector científico-tecnológico. En un marco de participación con esas características, la generación de una Federación de Sociedades sería un paso importante hacia adelante. Porque, de otra manera, nos aislaremos y no podremos juntarnos en los momentos que se requiera unidad en la acción.

De otra manera, al no haber espacios orgánicos de discusión, se genera una cultura de la queja sobre problemas personales o institucionales, pero siempre como solicitud aislada y con total imposibilidad práctica de plantear con la fuerza necesaria las demandas justas, o ejercer derechos, que podrían conseguirse con una acción coordinada sobre la base de principios previamente discutidos y acordados.

Lo que pasó en la década del '90 en varias instituciones es un ejemplo claro de que si hubiera habido una participación política efectiva y orgánica por parte de la comunidad científica y tecnológica en su conjunto, probablemente las reformas del Estado ejecutadas en ese período no hubieran llegado hasta donde finalmente llegaron, desmembrando áreas estratégicas del sector con componentes claros desde el punto de vista científico-tecnológico como YPF, Gas del Estado, Aguas, SOMISA, etc.

Sin embargo, cabe recordar que la participación activa de algunos miembros de la comunidad científico-tecnológica impidió que, en parte, las recomendaciones del Banco Mundial del año 1993 -taxativamente expresadas en el documento "*From insolvency to growth*"- no se plasmaran en la privatización del CONICET y la CNEA, entre otros organismos. Dichas propuestas fueron enarboladas con el argumento cínico de disminuir el gasto público, cuando lo que implícitamente se

buscaba era el desmantelamiento de las instituciones.

Por ello sería importante lograr construir un marco federativo en donde se puedan plantear orgánicamente problemas históricos y recurrentes como las becas, la inserción de los recursos humanos formados en el país, los métodos de evaluación, los beneficios sociales de los becarios, la transparencia en la adjudicación de subsidios, las áreas de vacancia temática, los temas prioritarios, etc. Pero la tarea no debe limitarse a las cuestiones puntuales que, aunque muy importantes, suelen tener causas más estructurales.

En efecto, es necesario pensar en participar más activamente en la confección de las políticas en ciencia y tecnología, así como controlar que las mismas se apliquen, o en cómo neutralizar las actitudes de funcionarios circunstanciales que se oponen -pero no lo expresan públicamente- a emprendimientos como la producción pública de medicamentos, vacunas, insumos médicos, kits de diagnóstico, erradicación de enfermedades, producción de anticuerpos monoclonales, etc. Todos ellos procesos que, de implementarse, generarían un impacto impresionante en el sector de las ciencias biomédicas, con una tracción que, partiendo de la tecnología llegaría hasta las mismas ciencias básicas, con el consiguiente ahorro de divisas y la absorción de recursos humanos calificados formados en universidades públicas.

Sin embargo, muy pocas veces se habla de estos temas en las sociedades científicas del área biomédica. O cuando se lo ha hecho ha sido en forma esporádica y con ánimos informativos o de conocimiento, pero inorgánicos e insuficientes para la disputa o la construcción.

Para evitar abstracciones, veamos algunos ejemplos -planteados como preguntas- en donde tener una participación política más activa seguramente no permitiría que ocurran algunos dislates.

¿Es socialmente razonable otorgar fondos para conocer el último nucleótido de un gen del *Trypanosoma cruzi* cuando ni siquiera se fumiga coordinadamente las áreas endémicas del mal de Chagas con el fin de eliminar la vinchuca?

¿Es socialmente razonable tener capacidad instalada para producir medicamentos o algunas vacunas y hacer investigación en esos rubros, y salir a comprarlos en el exterior?

¿Es socialmente razonable tener capacidad para producir sueros de buena calidad que identifican grupos sanguíneos y factor Rh y, por otro lado, permitir que una empresa de capitales argentinos se dedique a comprar bidones de los mismos en Escocia y aquí sólo los fraccione y los venda?

¿Es socialmente razonable tener capacidades potenciales como para abastecer adecuadamente de reactivos de diagnóstico a los hospitales públicos y no hacerlo?

¿Es socialmente razonable que desde el área de ciencia y tecnología no haya en ejecución ningún proyecto público de alto impacto económico o social?

Entonces, ¿de qué hablamos cuando decimos que el conocimiento se debe transferir a la sociedad? Una preocupación que, probablemente, sea compartida por muchas personas.

Ante estos procederes, la pregunta es: ¿qué hacemos? - ¿Seguimos

mirando el partido desde la tribuna o participamos para intentar incidir en algunas decisiones?

Por otra parte y en términos más amplios, ¿estamos totalmente de acuerdo con las políticas vigentes en ciencia y tecnología? ¿O pensamos que habría que modificarlas, incorporarles contenidos, o reorientarlas?

Estas opiniones cada uno las procesará o calificará de diferentes maneras, pero seguramente todos coincidiremos en que continuar con esa ausencia de ejecución de proyectos de amplio impacto social y económico -como los señalados arriba- no es el mejor camino a seguir. Y esto va mucho más allá de las naturales diferencias político partidarias que existen -y existirán- en el seno de cualquier sociedad científica, o cualquier colectivo.

Sólo hay que partir de conceptos más amplios e integradores como soberanía, inclusión social o desarrollo sustentable, por mencionar algunos, tanto como para poder generar consensos y asumir tareas conjuntas.

Cada uno también tendrá su respuesta o su posición frente a las preguntas formuladas arriba. Pero lo que debe quedar claro es que política hacemos todos, y siempre. Sea por acción u omisión y más allá de que nos guste, o no.

La diferencia está en que si la participación política se plantea desde la acción se pueden generar propuestas y, eventualmente, implementarlas. En cambio, el que prefiera hacerlo desde la omisión, sólo será funcional a las propuestas vigentes. Obviamente son elecciones personales, pero no son aspectos menores. Porque por ahí pasa lo que tendremos en el futuro.

En fin, son sólo algunas reflexiones puntuales.

■ REFERENCIAS:

- 1.- Pasqualini CD. La historia de la inmunología en Argentina. *Medicina* (Buenos Aires) 47, 673-5, 1987.
- 2.- Inmunología en Argentina. *Medicina* (Buenos Aires) 49, 97-100, 1989.
- 3.- Pasqualini CD. La historia de la inmunología en Argentina. Una visión personal. En *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la Medicina*. Anexo, Rabinovich G (ed), Buenos Aires. Editorial Panamericana, 2004, pp597-605.
- 4.- Summerlin WT, Broutbar C, Foanes RB, Payne R, Stutman O, Hayflick L, Good RA. Acceptance of phenotypically differing cultured skin in man and mice. *Transplant Proc.* 5, 707, 1973.
- 5.- Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:7.

PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Palabras clave: Escherichia coli; toxina Shiga; SUH
Key words: Escherichia coli; Shiga toxin; HUS

La forma típica o post-diarreica del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es la complicación más grave de las infecciones por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC). En Argentina el SUH es un problema crítico en salud pública, ya que representa la principal causa de falla renal aguda en la infancia, la segunda causa de falla renal crónica, y aporta el 20% de los casos de trasplante renal durante la infancia y la adolescencia. A pesar de los avances en el conocimiento de su patogénesis, el único tratamiento actual de los pacientes con SUH es sintomático, y no existen terapias específicas ni preventivas. En la presente revisión expondremos los conocimientos básicos de los mecanismos patogénicos, profundizando particularmente en los avances referidos a la contribución de la respuesta inmune, y discutiremos los enfoques terapéuticos tradicionales e

innovadores. La esperanza de que una mejor comprensión de la dinámica de transmisión y la patogénesis de esta enfermedad genere nuevos tratamientos más eficaces para prevenir la mortalidad y la morbilidad a largo plazo de las infecciones por cepas STEC y el SUH es la fuerza impulsora para intensificar la investigación en este campo.

The typical form of hemolytic uremic syndrome (HUS) is the major complication of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections. HUS is a critical health problem in Argentina since it is the main cause of acute renal failure in children and the second cause of chronic renal failure, accounting for a 20% of renal transplants in children and adolescents in our country. In spite of the extensive research in the field, the mainstay of treatment for patients with HUS is supportive therapy, and there are no specific therapies preventing or ameliorating the disease course. In this review, we present the current knowledge about pathogenic mechanisms with special focus in the contribution of immune response, and discuss traditional and innovative therapeutic approaches. The hope that a better understanding of transmission dynamics and pathogenesis of this disease will produce better therapies to prevent the mortality and the long-term morbidity of STEC-infections and HUS is the driving force for intensify research.

■ INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico participa en un sin fin de procesos, tanto fisiológicos como patológicos, a tra-

vés de sus dos brazos principales: la respuesta innata y la respuesta adaptativa. Entre ambas, mantienen a nuestro organismo sano a pesar de la continua exposición a patógenos

agresores. Pero también el sistema inmune participa directamente en la patogenia o el control de otras enfermedades cuya base no es inmunológica. En este sentido hoy se sabe que

■ **Abrey-Recalde, MJ;**
Cabrera, G;
Fernández-Brando RJ;
Mejías, MP;
Palermo, MS;
Panek CA; Ramos, MV.

Laboratorio de Patogenia e
Inmunología de Procesos
Infecciosos, Instituto de Medicina
Experimental, IMEX-CONICET,
Academia Nacional de Medicina.

la respuesta inflamatoria, manifestación de la respuesta innata, tiene un papel central en las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras patologías tales como la artritis. Por otro lado, la respuesta adaptativa es explotada en la generación de nuevas vacunas preventivas y terapéuticas no sólo contra enfermedades infecciosas, sino también contra el cáncer o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

En particular nuestro grupo de trabajo ha estudiado la participación de la respuesta innata y la respuesta adaptativa en la evolución y protección de una enfermedad de gran impacto en la salud pública de nuestro país tal como lo es el Síndrome Urémico Hemolítico típico o epidémico (SUH).

■ GENERALIDADES DEL SUH, IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN ARGENTINA

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por la triada anemia hemolítica microangiopática (ruptura mecánica de glóbulos rojos al pasar por los capilares ocluidos), trombocitopenia (drástica disminución del número de plaquetas en circulación por activación y deposición formando trombos) y daño renal agudo (daño del epitelio tubular y del endotelio glomerular), que afecta principalmente a lactantes y niños de la primera infancia, pudiendo afectar también a ancianos (Karmali 1989).

La forma típica del SUH es usualmente precedida por un episodio de diarrea sanguinolenta luego de la ingestión de alimentos contaminados con cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC). La toxina Shiga (Stx) es el factor patogénico esencial para el desarrollo del SUH. Dentro de las distintas variantes genéticas

conocidas, la Stx tipo 2 (Stx2) es la más patogénica y la que más se asocia con casos de SUH. La Stx se une a su receptor específico, el globotriaosilceramida (Gb3), presente en el endotelio y epitelio renal, induciendo muerte celular por inhibición de la síntesis proteica. Si bien existen varios serotipos de bacterias STEC capaces de producir enfermedad, en nuestro país el serotipo O157:H7 es el más frecuente (Rivas 2006). El principal órgano afectado es el riñón, aunque también pueden observarse lesiones severas en el sistema nervioso central, el colon y en el miocardio. (Gianantonio 1973).

A diferencia de lo que ocurre en el resto del mundo, donde se producen brotes epidémicos esporádicos de mayor o menor envergadura, en Argentina el SUH es endémico. Esto significa que se presentan casos durante todo el año y distribuidos a lo largo de todo el territorio nacional, alcanzando la mayor incidencia del mundo: 17,5 cada 100000 niños menores de 5 años. Esto convierte al SUH en la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes que se realizan en Argentina (Exeni 2001). La letalidad durante el período agudo ha sido reducida a 3-5%, debido al diagnóstico precoz de la enfermedad, la instauración temprana de la diálisis peritoneal y las transfusiones de sangre para contrarrestar la anemia producida por la destrucción de los glóbulos rojos. Del resto de los pacientes y superada la fase aguda, el 60% se recupera sin tener secuelas. Un 30% continúa con grados variables de disfunción renal que puede durar décadas y un 5% de los niños desarrolla una insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años hemodiálisis permanente o trasplante renal (Spizzirri 1997).

Esta patología implica un gran costo social y económico para el sistema de salud, no sólo por la alta complejidad de la atención que se requiere durante la etapa aguda, sino porque los niños que han padecido SUH necesitan seguimiento y tratamiento al menos hasta la adolescencia, sin contar los que requieren diálisis o trasplante renal (Caletti 2006).

En Argentina cada año se producen más de 500 nuevos casos de SUH (Rivas 2010). Hasta el presente no se cuenta con tratamientos específicos que logren controlar la evolución de la enfermedad, ni vacunas para prevenirla. El estudio de los mecanismos patogénicos y la epidemiología son la base racional que permite avanzar en el control de esta enfermedad.

■ MODELOS ANIMALES

Los animales de laboratorio son considerados fundamentales en la investigación biomédica y para un empleo apropiado de los mismos se han establecido normas, principios y legislaciones que regulan el uso desde un punto de vista ético (Barassi 1996).

A partir de investigaciones con animales de laboratorio se han generado numerosas vacunas, como las de la rabia, el ántrax, la viruela, el tétanos, la difteria, la tos convulsa y la poliomielitis, y se han conseguido avances importantes en la investigación sobre cáncer, cardiología, trasplantes de órganos, SIDA y otros (Klein 2000).

En el caso del SUH, es necesario el desarrollo de modelos animales que reproduzcan los aspectos de la infección por STEC en humanos para la generación y ensayo de vacunas y estrategias terapéuticas. En este sentido, varios modelos han sido desarrollados para evaluar la

colonización del intestino por las bacterias STEC, y el daño sistémico causado por la toxina Stx (Mohawk 2011).

En nuestro laboratorio se ha optimizado un modelo de infección de ratones en la edad del destete que reproduce varias de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad y demuestra que la edad es un factor importante que afecta la susceptibilidad a la infección (Brando 2008). Actualmente, dicho modelo está siendo empleado para investigar las alteraciones que produce la infección de bacterias STEC sobre el sistema inmune del intestino.

Por otra parte, nuestro grupo también emplea un modelo de SUH en el cual se inocula la Stx2 pura en el torrente sanguíneo del ratón, lo que permite analizar los efectos de esta toxina en los distintos tejidos y sistemas, una vez que pasa del intestino a la sangre. En base a este modelo, hemos demostrado que la reacción inflamatoria que acompaña este cuadro es determinante en la evolución y pronóstico de la enfermedad.

■ PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL DESARROLLO DEL SUH

La respuesta inflamatoria es la primera manifestación de la respuesta inmune frente a un agente agresor, en este caso una bacteria que es capaz de dañar el epitelio intestinal y producir una toxina sumamente agresiva para el ser humano. Si bien la inflamación es indispensable para montar una respuesta efectiva que proteja al individuo, su alto poder destructivo requiere estrictos mecanismos de control que limiten el grado y extensión de dicha respuesta inflamatoria. En algunas circunstancias una respuesta inflamatoria desmedida puede llegar a tornarse peligrosa dado que daña el propio

tejido del huésped.

Nuestro grupo de Inmunología ha establecido que la respuesta inflamatoria mediada por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), y los monocitos son importantes en la patogénesis del SUH ya que contribuyen al daño endotelial mediado directamente por la Stx, a través de la secreción de enzimas, especies reactivas del oxígeno y citoquinas (Dran 2002, Fernández 2000, Fernández 2006, Fernández 2007, Fernández 2002, Fernández 2012, Fernández 2005, Palermo 1999, Ramos 2007)(Figura 1).

Distintas quimioquinas como la interleuquina 8 (CCL8), la proteí-

na inflamatoria de macrófagos alfa (CCL3), ó el RANTES (CCL5), interactúan con sus receptores específicos presentes en los PMN y/o monocitos e inducen su reclutamiento en el riñón. Estas células activadas, con alto poder citotóxico, amplifican el daño endotelial mediado directamente por la Stx, potencian la respuesta inflamatoria y contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Figura 1, Ramos, 2012). Una evidencia a favor del papel determinante de los PMN y monocitos en la patogénesis del SUH, lo constituye el hecho de que la depleción de estas poblaciones celulares en el modelo murino, disminuye el daño renal y la muerte inducidos por la Stx.

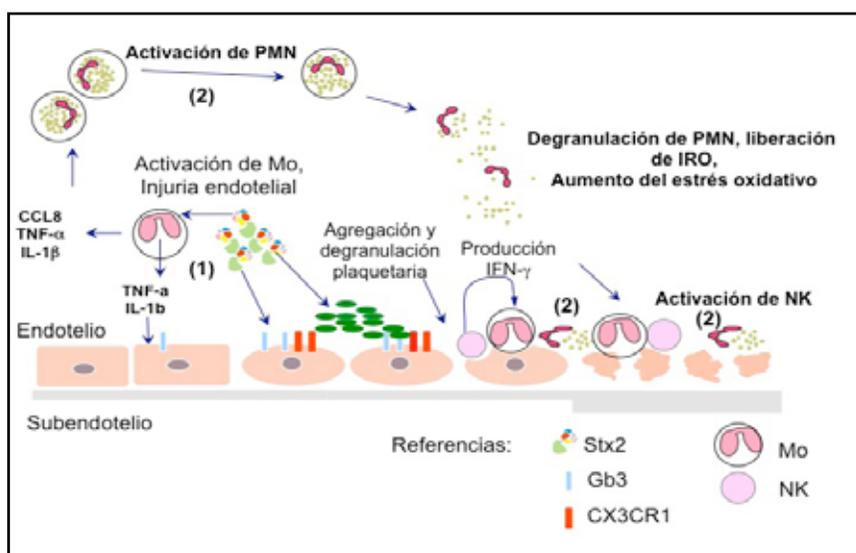


Figura 1: Participación de la respuesta innata en el daño por toxina Shiga (Stx2). En el esquema se representa el daño endotelial producido por diversas vías: **1) daño directo:** se produce por la interacción de la Stx2 con su receptor específico globotriaosilceramida o Gb3 en endotelio. El endotelio injuriado pasa a un estado pro-trombótico e inflamado, que produce citoquinas inflamatorias (TNF-α, IL-1b) y quimioquinas como CCL8. Simultáneamente, la Stx2 activa directamente a los monocitos (Mo) que liberan citoquinas y quimioquinas inflamatorias (TNF-α, IL-1b, CCL-8). **2) daño indirecto:** se produce por la activación de la respuesta innata y está mediado por las citoquinas inflamatorias secretadas por los Mo, cuyo blanco son el endotelio y los otros componentes celulares de la respuesta innata, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y las células Natural Killer (NK). En el endotelio se induce el aumento en la expresión de Gb3, de la expresión de P- y E-selectinas, y de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, como así también el aumento de la expresión de receptores para quimioquinas (ej. CX3CR1). Por su parte, los PMN y las células NK aumentan su adhesión al endotelio, lo cual promueve el daño a través de mecanismos citotóxicos de ambas poblaciones celulares (PMN: por degranulación e inducción del estallido respiratorio, aumento en la concentración de intermediarios reactivos del oxígeno o IRO y del estrés oxidativo; células NK: por liberación de perforinas).

Paralelamente a la respuesta inflamatoria desencadenada durante el SUH, se activan mecanismos anti-inflamatorios que pueden limitar la toxicidad renal específica de la Stx. Entre ellos, hemos demostrado que los glucocorticoides (GC) endógenos son factores fundamentales en el control de la inflamación durante el SUH (Palermo 2000). Así, la depleción de GC endógenos por adrenalectomía o por el tratamiento con un antagonista del receptor de GC (Ru486), aumenta el daño renal inducido por Stx2 (Gómez 2003). La protección mediada por los GC endógenos se encuentra asociada, al menos en forma parcial, a su capacidad para contrarrestar las funciones inflamatorias de los PMN (Gómez 2005). De esta forma, la interacción entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino modula el nivel de daño generado durante el desarrollo del SUH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelo animal, analizamos algunos parámetros inmunológicos en los pacientes con SUH. Así encontramos que al momento del diagnóstico de SUH, tanto monocitos como PMN, presentan profundas alteraciones fenotípicas y funcionales. Los pacientes presentan un marcado aumento en el número de leucocitos PMN en sangre periférica, pero presentan una capacidad de respuesta francamente disminuida, por lo cual se consideran "agotados". Dado que los PMN son células terminales, mueren luego de participar en un proceso patológico. El hallazgo de los PMN agotados, exhaustos, nos sugiere que estas células sufrieron un proceso previo de activación muy marcado, tras el cual y luego de liberar su potencial tóxico al entorno (contribuyendo al daño de vasos y tejidos) se encuentran con una función disminuida. Contrariamente a los PMN, los monocitos al ser activados se diferencian hacia di-

ferentes fenotipos, que cumplen funciones específicas. En este caso, en los monocitos de los pacientes con SUH se observaron cambios que sugieren un estado *inflamatorio* con mayor capacidad citotóxica. Ambos parámetros, el nivel de agotamiento de los PMN y el perfil inflamatorio de los monocitos, correlacionan con la severidad del cuadro de SUH. Estos datos sugieren que el análisis de los componentes celulares de la respuesta inflamatoria (PMN y monocitos) en los pacientes con SUH aporta una herramienta valiosa no sólo como indicador del pronóstico del paciente, sino que abre una posibilidad de intervención en el proceso patológico. Así, la identificación de los pacientes que cursan un proceso más agresivo permitiría aplicar un tratamiento preventivo en la etapa de la diarrea exclusivamente a aquellos que muestran altas posibilidades de desarrollar SUH.

La respuesta inmune también incluye la posibilidad de montar una respuesta específica protectora, evidenciada en muchos casos por la presencia de anticuerpos. En el caso del SUH, la presencia de anticuerpos anti-Stx que bloquean la toxina ha sido sugerida como indispensable para la no repetición de esta enfermedad. Recientemente estudiamos la presencia de anticuerpos contra la Stx en niños luego de haber sufrido el SUH, y en un grupo de niños controles, sanos (Fernández-Brando 2011). Entre los hallazgos destacamos que efectivamente luego de haber tenido SUH, un mayor porcentaje de niños presentan anticuerpos anti-Stx2, sugiriendo que estos anticuerpos podrían contribuir a prevenir un segundo episodio de SUH. Pero tal vez, más interesante fue encontrar también entre los controles, niños sanos y que no habían padecido SUH en el pasado, un número muy elevado de sueros positivos anti-Stx2 (67%) en compa-

ración a los porcentajes referidos en otros países como Alemania (10%) o Canadá (46%) (Karmali 2003, Ludwig 2001). Además, niños que habían sufrido un episodio de SUH hacía más de 10 años continuaban presentando anticuerpos contra la Stx2. Esto podría estar relacionado al comportamiento endémico de la enfermedad en nuestro país, en el cual un porcentaje alto de nuestra población esta expuesto al agente patógeno sin tener manifestaciones clínicas. Por otra parte, cuando estudiamos la frecuencia de anticuerpos dirigidos contra la Stx1, todos los grupos presentaron frecuencias similarmente bajas, menores al 10%. Estos resultados concuerdan con datos epidemiológicos que muestran una amplia circulación de cepas productoras de Stx2 en la Argentina, y una casi nula presencia de cepas productoras de Stx1.

■ RESERVORIOS Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Numerosos estudios realizados en diferentes países, incluyendo a la Argentina permitieron confirmar que el intestino del ganado vacuno es el mayor reservorio de cepas STEC. Por lo tanto, la principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados: productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, principalmente carne picada en forma de hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla; derivados lácteos como leche no pasteurizada, yogur, quesos; pero también papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Rivas 2006). La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino, en forma directa durante el faenamiento o a través del medioambiente por arrastre del agua de lluvias. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los

animales de granja, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral

■ PREVENCIÓN

Existen varias estrategias posibles que podrían ser usadas para reducir la incidencia y/o los efectos de la infección con STEC en humanos. Debido a que el ganado bovino es el principal reservorio de STEC, una opción sería vacunar al ganado con el fin de reducir la carga de STEC y minimizar la contaminación en la carne a ser utilizada en alimentación humana. Algunos de los antígenos blanco incluyen proteínas involucradas en la colonización (proteínas de secreción tipo III, intimina) o el lipopolisacárido O157. Aunque la inmunización del ganado con algunas de estas proteínas fue capaz de montar una respuesta de anticuerpos y de reducir la carga de *E. coli* O157:H7 (Potter 2004), en un estudio comercial a gran escala realizado en Canadá dicha vacunación no aportó grandes beneficios. Diversos estudios han mostrado que si bien estos protocolos de vacunación disminuyen la colonización y la carga bacteriana inicial, todavía no logran controlar la persistencia de estas bacterias en el intestino del bovino (Van Donkersgoed 2005). Otro problema que acarrea la vacunación del ganado es que implicaría la vacunación de un gran número de animales, generando un importante costo económico para la industria ganadera, poco dispuesta a afrontarlo teniendo en cuenta que las infecciones con STEC no interfieren con el rendimiento económico del ganado. Sin embargo, la vacunación no es la única opción de intervención en este punto de la cadena productiva de *la vaca a la boca*. Se ha observado que la administración de un coctel de bacterias *E. coli* no patógenas es capaz de reducir sig-

nificativamente la excreción de *E. coli* O157:H7 en el ganado (Tkalcic 2003, Zhao 1998, Zhao 2003). Estas bacterias no patógenas son capaces de excluir competitivamente a *E. coli* O157:H7 tanto del ganado adulto como de los terneros neonatales y al destete, a través de la producción de colicinas (proteínas que específicamente atacan a *E. coli*). Otra bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, también ha demostrado ser capaz de reducir la carga de *E. coli* O157:H7 en el ganado en feedlot hasta un 50% (Brashears 2003, Elam 2003, Younts-Dahl 2005). Este producto se encuentra disponible comercialmente en Estados Unidos (Callaway 2004). Vale aclarar que ninguna de estas intervenciones se realiza actualmente en Argentina.

Otra posible estrategia es la administración de bacteriófagos (virus que específicamente matan bacterias). Los bacteriófagos son altamente específicos, incluso pueden ser específicos contra una sola cepa de bacterias. Por lo tanto, su uso ha sido propuesto como una estrategia para eliminar patógenos en poblaciones microbiológicas mixtas. A pesar de que diversos estudios presentan resultados variables, en algunos se ha observado reducción de los niveles de *E. coli* O157:H7 (Bach 2009, Sheng 2006) resultando, incluso, en una patente en Estados Unidos (Waddell 2002). La principal desventaja del uso de bacteriófagos es que, si bien O157:H7 es el serotipo predominante causante del SUH, no es el único. Por este motivo, deberían considerarse el desarrollo y uso de mezclas de bacteriófagos con capacidad de infectar a distintos serotipos bacterianos, encareciendo la aplicación de este protocolo.

Como se dijo anteriormente, otra opción es la vacunación en humanos. Distintas estrategias se han analizado en modelos animales.

La toxina Shiga posee una subunidad A tóxica unida a un pentámero de subunidades B encargado de la unión a su receptor específico presente en las membranas celulares. Ya que la subunidad B aislada no manifiesta efectos tóxicos, diversos protocolos la han utilizado como inmunógeno (McEwen 1989). Sin embargo, la subunidad B de Stx2, variante epidemiológica y clínicamente más relevante, ha mostrado ser poco inmunogénica y difícil de expresar y purificar, aparentemente por presentar una estructura inestable (Acheson 1995). En nuestro laboratorio hemos generado una vacuna a ADN, que consiste en un plásmido codificante para la subunidad B de Stx2 junto con un pequeño fragmento (la parte que carece de actividad tóxica) de la subunidad A. Esta construcción fue capaz de generar en ratones una respuesta humoral específica que protegió parcialmente (el 50%) de los animales inoculados con una dosis letal de Stx2. Si bien la eficacia de protección mejoró al administrarla conjuntamente con un estimulador de la función y maduración de células dendríticas (sobrevivió el 70% de los animales) (Bentancor 2009), seguimos trabajando en la búsqueda de un inmunógeno que genere una respuesta humoral capaz de proteger al 100% de los animales. Otros grupos han generado proteínas de fusión entre las subunidades B de Stx1 y Stx2 (Gao 2009), entre la subunidad A de Stx2 y la B de Stx1 (Cai 2011), la subunidad B de Stx2 inmunizada por vía oral (Tsuji 2008) o un toxoide de Stx2 expresado en plantas (Wen 2006). En todos estos casos se obtuvieron distintos grados de protección parcial en el modelo murino. El desarrollo de un inmunógeno eficaz y seguro, que genere una respuesta humoral protectora, capaz de neutralizar o bloquear a la toxina Stx2 de manera eficiente es el punto clave para luego generar una vacuna profiláctica

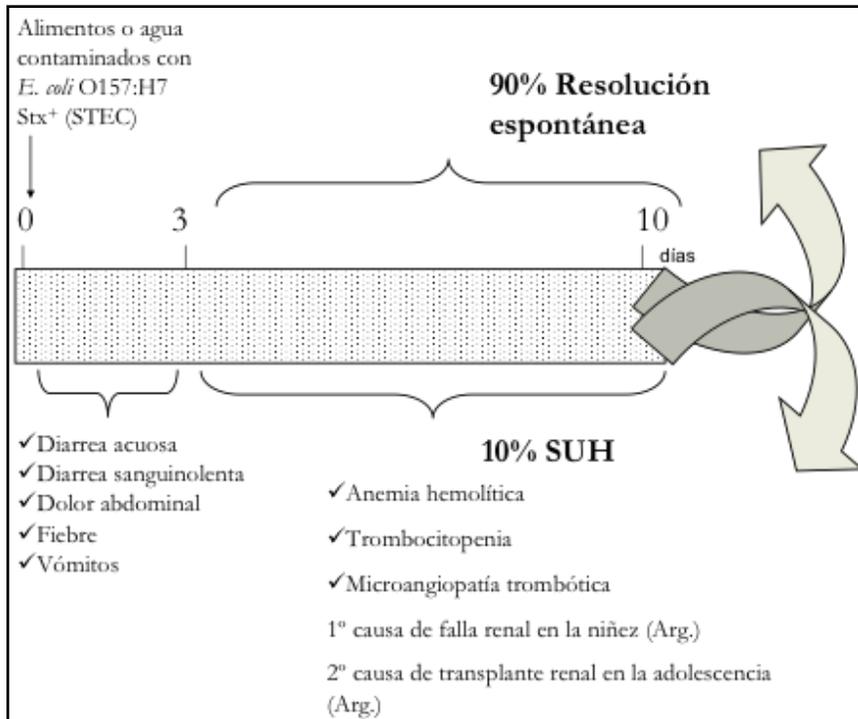


Figura 2: Esquema de progresión de las infecciones por *E. coli* O157:H7 en niños. Dentro de los 3 días posteriores a la ingesta de las bacterias, el paciente desarrolla diarrea, dolor abdominal, fiebre, vómitos. Luego de 1-2 días (o a veces antes) la diarrea suele transformarse en sanguinolenta en el 80-90% de los casos. Durante estas instancias los pacientes presentan un recuento de plaquetas normal, función renal conservada y hematocrito normal, sin fragmentación de glóbulos rojos. Sin embargo, ya pueden observarse ciertos parámetros de activación tanto de la respuesta inflamatoria como de los sistemas de coagulación y fibrinolítico. Aún así, en el 90% de los casos la infección se resuelve espontáneamente, sin desarrollar el SUH en su forma completa. Dentro de los niños que evolucionan a SUH, el 70-80% se resolverá sin dejar secuelas, el 25-30% quedará con distintos grados de disfunción neurológica y/o renal, y en menos del 5% de los casos, generalmente aquellos casos con compromiso neurológico temprano y agudo, su desenlace será la muerte.

se encuentra en fase III, y ha sido aplicada a un grupo piloto de niños en Estados Unidos, ha mostrado inducir una respuesta de anticuerpos séricos anti-LPS O157 que decae muy rápidamente y no se aportaron datos del nivel de anticuerpos generados en mucosas. Por lo tanto esta vacuna tiene dos desventajas: solo estaría protegiendo los casos de SUH desarrollados luego de las infecciones con cepas STEC del serotipo O157:H7, y además la protección sería de corta duración.

■ TRATAMIENTO

Aunque se ha discutido mucho acerca de las ventajas y desventajas del uso de antibióticos durante la etapa previa al SUH, actualmente existe consenso acerca de que el tratamiento con antibióticos está contraindicado en casos de sospecha o confirmación de infecciones con STEC entéricos (Wong 2000), fundamentalmente porque estos agentes inducen mayor producción o liberación de toxina (Wong 2000), lo que aumenta el daño al huésped.

La base del tratamiento para los pacientes con SUH es la terapia de apoyo, que generalmente incluye: control de fluidos y electrolitos, control de la hipertensión, y uso de diálisis y transfusiones de sangre, según se requiera, no existiendo hasta el momento alguna intervención específica previa o durante las primeras etapas de la enfermedad que logren controlar el nivel de daño en los tejidos blanco.

Sin embargo, durante los últimos diez años se han ensayado distintas estrategias terapéuticas específicas. Uno de los primeros enfoques en la búsqueda de tratamientos específicos que despertó gran interés entre los nefrólogos pediátricos, fue la idea de adsorber la Stx libre en el intestino a través de compuestos

o una vacuna terapéutica. Más allá de los inconvenientes técnicos que dificultan la obtención de un buen inmunógeno, para implementar una nueva vacuna profiláctica se deben contemplar otros aspectos como la incidencia, la relación costo-eficacia, etc. Sin embargo, el desarrollo de un inmunógeno efectivo contra Stx2 es un objetivo válido para desarrollar vacunas terapéuticas o anticuerpos protectores para administrar durante un brote epidémico por contaminación con cepas patógenas STEC, en el período ventana entre el desarrollo de los signos y síntomas de infección gastrointestinal y el desarrollo de su complicación

sistémica (Figura 2). En este sentido el brote ocurrido durante el año 2011 en Europa, específicamente en Alemania y Francia (Beutin 2012, Borgatta 2012, Werber 2012), en el que se produjeron más de 800 casos de SUH y alrededor de 60 muertes, mostró las consecuencias de no contar con un agente terapéutico específico para prevenir el SUH durante un brote masivo.

Otra estrategia ha sido el desarrollo de una vacuna a base del componente mayoritario de la parte externa de las bacterias *E. coli* O157:H7, el lipopolisacárido (LPS) (Ahmed 2006). Aunque esta vacuna

amorfos ó inertes. Con este fin, se desarrolló y ensayó un compuesto derivado de diatomeas unido a una cadena de oligosacárido conocido con el nombre comercial Synsorb® Pk, para ser administrado oralmente. Sin embargo, a pesar de su alto potencial para unir y neutralizar la Stx *in vitro*, cuando se lo probó en ensayos clínicos, no resultó beneficioso en prevenir o disminuir la severidad de las complicaciones sistémicas (Palermo 2009). Luego se desarrollaron diversas estrategias con fines similares, que incluyeron polímeros de Gb3 o bacterias recombinantes que expresan el receptor Gb3 en su membrana, los cuales arrojaron buenos resultados al ser ensayados en modelos animales pero nunca fueron probados en humanos (Paton 2001). El mayor inconveniente que tienen estos tratamientos experimentales es que aún trazas de Stx que logren escapar de sus agentes bloqueantes en el intestino e ingresar a la circulación, serían suficientes para inducir el SUH. Debido a estas consideraciones, se comenzaron a desarrollar polímeros del receptor para Gb3 para ser administrados por vía sistémica. Entre ellos, Starfish es un nuevo compuesto que une Stx con 1000 veces mayor eficiencia que Synsorb® Pk y se administra por vía endovenosa. Sin embargo, este compuesto mostró buena capacidad para unir y neutralizar Stx1 pero no Stx2. Dado que la variante Stx2, es la que presenta mayor potencial para desencadenar SUH, se desarrolló un nuevo compuesto denominado Daisy, que al menos experimentalmente tiene capacidad para neutralizar la Stx1 y la Stx2. Con este mismo objetivo, un grupo japonés creó otro compuesto llamado SUPER TWIGS, que está formado por 18 trisacáridos de globotriaosilceramida, que no sólo une la Stx en circulación sino que induce su captación y eliminación por los macrófagos (Nishikawa 2005).

Más recientemente, diversos laboratorios han desarrollado anticuerpos monoclonales, humanizados o no, para ser administrados en el período ventana entre la aparición de la diarrea sanguinolenta, una vez confirmada su asociación con bacterias STEC (Mukherjee 2002). La idea es esencialmente la misma: bloquear la toxina Stx2 antes de que interactúe con su receptor presente en la membrana de las células blanco. En la actualidad existen evidencias suficientes que han demostrado que el agente que pretenda bloquear la toxina debe tener una alta capacidad de unión ó afinidad, en el caso de tratarse de anticuerpos, y que este complejo toxina-bloqueante sea eliminado de la circulación de manera eficiente.

Otra estrategia en fase aún experimental, que ha mostrado algunos resultados promisorios, es el uso de drogas que bloquean transitoria y reversiblemente la síntesis de los receptores Gb3 (Silberstein 2009). Estas drogas, que se usan para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, podrían ser usadas en la etapa previa al diagnóstico de SUH para disminuir la expresión de receptores específicos y de esta manera el nivel de daño a los tejidos.

Incluso cuando algunos de los tratamientos específicos que están siendo ensayados resulten aprobados para su aplicación, la eficacia de los mismos depende de su implementación sumamente temprana. Por lo tanto, son imperativos la educación de la comunidad que permita instaurar la idea de la necesidad de una consulta rápida con los especialistas ante la presencia de diarrea, el mejoramiento de los sistemas de vigilancia y salud que permitan la toma de muestra biológica con la suficiente premura, y el desarrollo de métodos de diagnóstico simples y económicos, que posibiliten su implementación en todos los pun-

tos del país, junto con la identificación de indicadores o predictores de mala evolución, para identificar aquéllos niños con alta probabilidad de desarrollar complicaciones.

■ PERSPECTIVAS ACTUALES DE CONTROL

Como se ha discutido, no hay perspectivas a corto plazo de contar con la aplicación de protocolos de inmunización en ganado bovino o en seres humanos, y/o tratamientos específicos para prevenir o controlar el daño durante el SUH. Por lo tanto, nuestra mejor forma de disminuir los estragos producidos por el SUH es la prevención, y para esto lo mejor es prevenir las infecciones primarias con STEC. Particularmente en nuestro país, se requieren controles más estrictos en todos los puntos de la cadena alimentaria que aseguren el cumplimiento de las leyes y normativas de control bromatológico, y políticas educativas dirigidas a toda la población, específicas y sostenidas en el tiempo, que permitan a todos los consumidores y especialmente a aquellos que manipulan alimentos para la población de riesgo, conocer las medidas sanitarias necesarias para tener una alimentación segura. La amplia difusión de las medidas de prevención básicas aconsejadas por la Sociedad Argentina de Pediatría y organizaciones no gubernamentales que trabajan para el control de esta enfermedad (www.lusuh.org.ar) podría ser una ayuda importante.

■ REFERENCIAS

- Acheson DW, De Breucker SA, Jaczewicz M, Lincicome LL, Donohue-Rolfe A, Kane AV, Keusch GT. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. *Infection and Immunity* 63: 301-308. 1995.
- Ahmed A, Li J, Shiloach Y, Robbins JB, Szu SC. Safety and immunogeni-

- city of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2-5-year-old children. *Journal of Infectious Diseases* 193: 515-521. 2006.
- Bach SJ, R. P. Johnson, K. Stanford, and McAllister T. A. Bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in experimentally inoculated sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 89: 285-293. 2009.
- Barassi N, Benavides F, Ceccarelli A. [Ethics in the use of experimental animals]. *Medicina (B Aires)* 56: 531-532. 1996.
- Bentancor LV, Bilen M, Brando RJ, Ramos MV, Ferreira LC, Ghiringhelli PD, Palermo MS. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. *Clinical and Vaccine Immunology* 16: 712-718. 2009.
- Beutin L, Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of Food Protection* 75: 408-418. 2012.
- Borgatta B, Kmet-Lunacek N, Rello J. E. coli O104:H4 outbreak and haemolytic-uraemic syndrome. *Medicina Intensiva*. In press doi:10.1016/j.medint.2011.11.022. 2012
- Brando RJ, Miliwebsky E, Bentancor L, Deza N, Baschkier A, Ramos MV, Fernandez GC, Meiss R, Rivas M, Palermo MS. Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. *Clinical & Experimental Immunology* 153: 297-306. 2008.
- Brashears MM, Galyean ML, Lonergan GH, Mann JE, Killinger-Mann K. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *Journal of Food Protection* 66: 748-754. 2003.
- Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, Xiao L, Tian M, Liu Y, Wang H. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine* 29: 946-952. 2011.
- Caletti MG, Petetta D, Jaitt M, Casaliba S, Gimenez A. [Hemolytic uremic syndrome (HUS): medical and social costs of treatment]. *Medicina (B Aires)* 66 (3): 22-26. 2006.
- Callaway TR, Anderson RC, Edrington TS, Genovese KJ, Bischoff KM, Poole TL, Jung YS, Harvey RB, Nisbet DJ. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *Journal of Animal Science* 82 E-Suppl: E93-99. 2004.
- Dran GI, Fernandez GC, Rubel CJ, Bermejo E, Gomez S, Meiss R, Isturiz MA, Palermo MS. Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney International* 62: 1338-1348. 2002.
- Elam NA, Gleghorn JF, Rivera JD, Galyean ML, Defoor PJ, Brashears MM, Younts-Dahl SM. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *Journal of Animal Science* 81: 2686-2698. 2003.
- Exeni R. Síndrome Urémico Hemolítico. *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica* 1: 35-56. 2001.
- Fernandez-Brando RJ, Bentancor LV, Mejias MP, Ramos MV, Exeni A, Exeni C, Laso Mdel C, Exeni R, Isturiz MA, Palermo MS. Antibody response to Shiga toxins in Argentinean children with enteropathic hemolytic uremic syndrome at acute and long-term follow-up periods. *PLoS One* 6: e19136. 2011.
- Fernandez GC, Rubel C, Dran G, Gomez S, Isturiz MA, Palermo MS. Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clinical Immunology* 95: 227-234. 2000.
- Fernandez GC, Lopez MF, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Landoni VI, Dran GI, Meiss R, Isturiz MA, Palermo MS. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clinical & Experimental Immunology* 146: 76-84. 2006.
- Fernandez GC, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Landoni VI, Lopez L, Ramirez F, Diaz M, Alduncin M, Grimoldi I, Exeni R, Isturiz MA, Palermo MS. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Research* 61: 123-128. 2007.

- Fernandez GC, Rubel C, Barrionuevo P, Lopez L, Ramirez F, Diaz M, Isturiz MA, Palermo MS. Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology* 17: 337-344. 2002.
- Fernandez GC, Ramos MV, Landoni VI, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Exeni R, Laso MD, Exeni A, Grimoldi I, Isturiz MA, Palermo MS. Cytokine Production Is Altered in Monocytes from Children with Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*. 32:622-631. 2012.
- Fernandez GC, Ramos MV, Gomez SA, Dran GI, Exeni R, Alduncin M, Grimoldi I, Vallejo G, Elias-Costa C, Isturiz MA, Palermo MS. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 853-861. 2005.
- Gao X, Cai K, Shi J, Liu H, Hou X, Tu W, Xiao L, Wang Q, Wang H. Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine* 27: 2070-2076. 2009.
- Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Gallo GE, Sojo ET. The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron* 11: 174-192. 1973.
- Gomez SA, Fernandez GC, Vanzulli S, Dran G, Rubel C, Berki T, Isturiz MA, Palermo MS. Endogenous glucocorticoids attenuate Shiga toxin-2-induced toxicity in a mouse model of haemolytic uraemic syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 131: 217-224. 2003.
- Gomez SA, Fernandez GC, Camerano G, Dran G, Rosa FA, Barrionuevo P, Isturiz MA, Palermo MS. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil function in a murine model of haemolytic uraemic syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 139: 65-73. 2005.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Petric M, Dutil L, Rahn K, Ludwig K, Arbus GS, Michel P, Sherman PM, Wilson J, Johnson R, Kaper JB. Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxins) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *Journal of Infectious Diseases* 188: 1724-1729. 2003.
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2: 15-38. 1989.
- Klein S. El uso de animales en la investigación biomédica. *Revista Ciencia hoy en línea* 10: 55. 2000.
- Ludwig K, Karmali MA, Sarkim V, Bobrowski C, Petric M, Karch H, Müller-Wiefel DE. Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2272-2279. 2001.
- McEwen J, Leitner M, Harari I, Arnon R. Expression of Shiga toxin epitopes in *E. coli* immunological characterization. *Immunology Letters* 21: 157-163. 1989.
- Mohawk KL, O'Brien AD. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 258185. 2011.
- Mukherjee J, Chios K, Fishwild D, Hudson D, O'Donnell S, Rich SM, Donohue-Rolfe A, Tzipori S. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infection and Immunity* 70: 612-619. 2002.
- Nishikawa K, Matsuoka K, Watanabe M, Igai K, Hino K, Hatano K, Yamada A, Abe N, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y. Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. *Journal of Infectious Diseases* 191: 2097-2105. 2005.
- Palermo M, Alves-Rosa F, Rubel C, Fernandez GC, Fernandez-Alonso G, Alberto F, Rivas M, Isturiz M. Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clinical & Experimental Immunology* 119: 77-83. 2000.
- Palermo MS, Alves Rosa MF, Van Rooijen N, Isturiz MA. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clinical & Experimental Immunology* 116: 462-467. 1999.
- Palermo MS, Exeni RA, Fernandez GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 7: 697-707. 2009.
- Paton AW, Morona R, Paton JC. Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c, and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. *Infection and Immunity* 69: 1967-1970. 2001.
- Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D, Erickson G, Hinkley S, Klopfenstein

- T, Moxley RA, Smith DR, Finlay BB. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 22: 362-369. 2004.
- Ramos MV, Auvynet C, Poupel L, Rodero M, Mejias MP, Panek CA, Vanzulli S, Combadiere C, Palermo M. Chemokine receptor CCR1 disruption limits renal damage in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *The American Journal of Pathology* 180: 1040-1048. 2012.
- Ramos MV, Fernandez GC, Patey N, Schierloh P, Exeni R, Grimoldi I, Vallejo G, Elias-Costa C, Del Carmen Sasiain M, Trachtman H, Combadiere C, Proulx F, Palermo MS. Involvement of the fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome. *Blood* 109: 2438-2445. 2007.
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM;. The Case-Control Study Group: Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease* 3: 88-96. 2006.
- Rivas M, Padola, N. L., Lucchesi, P. M. A., Masana, M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. In Torres AGE (ed)^(eds): *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*, Bentham Science Publishers Ltd. 142-161. 2010.
- Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5359-5366. 2006.
- Silberstein C, Copeland, DP, Chiang, W., Repetto, HA., Ibarra C. A Glucosylceramide synthase inhibitor prevents the cytotoxic effects of Shiga Toxin-2 on human renal tubular epithelial cells. *Journal of Epithelial Biology & Pharmacology* 1: 71-75. 2009.
- Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatric Nephrology* 11: 156-160. 1997.
- Tkalcic S, Zhao T, Harmon BG, Doyle MP, Brown CA, Zhao P. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 66: 1184-1189. 2003.
- Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Shimizu Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Sugiyama S, Taniguchi K, Neri P, Mori H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine* 26: 469-476. 2008.
- Van Donkersgoed J, Hancock D, Rogan D, Potter AA. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal* 46: 724-728. 2005.
- Waddell TE, A. Mazzocco, J. Pacan, R. Ahmed, R. Johnson, C. Poppe, and Khakhria, R. Use of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7. In (ed)^(eds): U.S.: 2002.
- Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7082-7087. 2006.
- Werber D, Krause G, Frank C, Fruth A, Flieger A, Mielke M, Schaade L, Stark K. Outbreaks of virulent diarrhoeagenic *Escherichia coli* - are we in control? *BMC Medicine* 10: 11. 2012.
- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The New England Journal of Medicine* 342: 1930-1936. 2000.
- Younts-Dahl SM, Osborn GD, Galyean ML, Rivera JD, Lonergan GH, Brashears MM. Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *Journal of Food Protection* 68: 6-10. 2005.
- Zhao T, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Mueller PO, Parks AH. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 641-647. 1998.
- Zhao T, Tkalcic S, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Zhao P. Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 66: 924-930. 2003.

Infecciones ocasionadas por biofilms bacterianos. Causas de su dificultad para erradicarlas

Palabras claves: Biofilm, inmunidad innata, neutrófilo
Key words: Biofilm, innate immunity, neutrophil

Los biofilms son comunidades complejas de bacterias rodeadas por una matriz extracelular que crecen adheridas a una superficie viva o inerte. Ellos representan un modo de crecimiento de resistencia, permitiendo a la bacteria sobrevivir en ambientes hostiles. El modo de crecimiento en biofilm tiene consecuencias importantes en la industria y la salud humana. Los biofilms son responsables de más del 60% de las infecciones bacterianas humanas, entre ellas infecciones que ocasionan neumonía en pacientes con fibrosis quística, otitis o periodontitis. También son responsables de infecciones sobre prótesis o dispositivos médicos, como infecciones en catéteres endovasculares. Los biofilms resultan difíciles de erradicar dado que presentan características que los hacen resistentes a la acción de agentes antimicrobianos. A pesar de que el sistema inmune del huésped es capaz de responder a la presencia de una bacteria creciendo en modo biofilm, en muchos casos no logra erradicarlos puesto que los biofilms imponen distintas estrategias para evadir su acción. La imposibilidad de erradicar la infección conduce a una activación exacerbada del sistema inmune resultando en el daño colateral de los tejidos del huésped. El entendimiento de las bases genéticas y moleculares del crecimiento bacteriano en comunidades, así como de su interacción con el sistema inmune del huésped están brindando nuevos blancos terapéuticos que contribuirán al desarrollo de estrategias para controlar las infecciones por biofilms.

■ **María Laura Gabelloni,
Florence Sabbione y
Analía Trevani**

Instituto de Medicina Experimental
(IMEX)-CONICET,
Academia Nacional de Medicina y Depto. de Micro-
biología, Parasitología e Inmunología, Facultad de
Medicina, UBA. Buenos Aires, Argentina.
analiatrevani@yahoo.com.ar

Biofilms are complex communities of bacteria enclosed in an extracellular matrix that grow attached to a living or inert surface. They represent a resistance mode of growth, allowing the bacteria to survive in hostile environments. The biofilm mode of growth has major consequences on industry and human health. Biofilms are responsible for more than 60% of all human bacterial infections, and among them, infections that cause pneumonia in cystic fibrosis patients, otitis or periodontitis. They are also responsible for infections on prosthesis and medical devices, such as intravenous catheter infections. Biofilms are difficult to eradicate, exhibiting characteristics that make them less sensitive to the action of antimicrobial agents. Moreover, although the host immune system is able to respond to bacteria growing as biofilms, in many cases it fails to eradicate these communities because of their effective immune evasion strategies. The incapacity to eradicate the infection leads to an exacerbated activation of the immune system resulting in collateral damage of the host tissues. The understanding of the genetic and molecular basis of the biofilm mode of growth, as well as its interactions with the host immune system are providing new therapeutic targets that will surely contribute to the development of strategies to control biofilm-mediated infections.

■ INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariontes que

habitan naturalmente en el medio ambiente, así como también dentro de organismos huéspedes como los animales. En ambos casos, las bac-

terias pueden existir como células planctónicas, es decir, de vida libre, o como células sésiles que crecen adheridas a una superficie. La

forma inmovilizada de crecimiento recibe el nombre de biopelícula o, más ampliamente difundido, biofilm. Un biofilm no es simplemente un ensamblaje de células adheridas a una superficie, sino que es un ecosistema microbiano organizado, con características funcionales y estructurales complejas, donde abunda la comunicación química célula-célula (del Pozo J.L., 2007).

A mediados del siglo pasado, el microbiólogo Claude Zobell del Instituto de Oceanografía Scripps, de la Universidad de California, notó que las bacterias acuáticas eran más numerosas sobre las superficies sólidas de los contenedores que como células individuales en suspensión (Zobell C.E., 1943). En base a estas observaciones se concluyó que las bacterias prefieren un estilo de vida comunitario asociado a superficies a una existencia nómada. Hoy sabemos que el biofilm representa un modo de crecimiento de resistencia que permite a las bacterias sobrevivir en ambientes hostiles y también dispersarse y colonizar nuevos nichos (Hall-Stoodley L., 2004).

■ COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS BIOFILMS

Los biofilms pueden estar formados por bacterias de una o varias especies diferentes (O'Toole G., 2000). Asimismo, se han encontrado biofilms formados por hongos unicelulares (que son organismos eucariotas) y también por bacterias y hongos. En este artículo nos centraremos en los biofilms bacterianos.

La superficie sobre la cual se ensambla un biofilm puede ser de origen abiótico, como por ejemplo, una roca o una prótesis, o de origen biótico, como es el caso de los biofilms que colonizan los pulmones de pacientes con fibrosis quística (O'Toole G., 2000). El grosor de un

biofilm es variable y desparejo, en general se encuentra entre los 13 y los 60 μm , y está determinado por el equilibrio entre su crecimiento y la liberación de biomasa al ambiente. La composición del biofilm es también variable. Las bacterias por sí mismas comprenden una fracción del volumen del biofilm, generalmente entre el 5 y el 35% (del Pozo J.L., 2007). El resto del volumen está compuesto por una matriz extracelular formada por un complejo polianiónico muy hidratado de exopolisacáridos de origen bacteriano, ADN y proteínas (McDougald D., 2012). La composición del exopolisacárido que constituye la matriz es diferente en cada bacteria: alginato en *Pseudomonas aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae*, polyn-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus*, entre otros (del Pozo J.L., 2007). Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm.

Típicamente, la estructura de un biofilm consta de bacterias sésiles creciendo en microcolonias hete-

rogéneas inmersas en la matriz, surcadas por canales abiertos donde circula fluido (Figuras 1 y 2) (Hall-Stoodley L., 2004). Esta arquitectura compleja fue uno de los primeros indicadores de que el desarrollo de los biofilms no es simple ni uniforme, sino complejo y diferenciado (McDougald D., 2012). Los canales permiten la difusión de moléculas como oxígeno y nutrientes. Sin embargo, la existencia de canales no evita que dentro del biofilm existan ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, de oxígeno y el pH varíen. Por ejemplo, existe un gradiente de oxígeno dentro del biofilm, razón por la cual las bacterias que se encuentran cercanas a su base inmersas en la matriz se localizan en un ambiente anaeróbico, mientras que los canales llenos de agua contienen oxígeno disuelto, proveyendo un medio aeróbico a las bacterias que se encuentran en su proximidad (del Pozo J.L., 2007). Estas circunstancias aumentan la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm.

■ ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE UN BIOFILM

El desarrollo de un biofilm ocurre en una secuencia regulada de pasos (Figura 3). Las dos primeras etapas

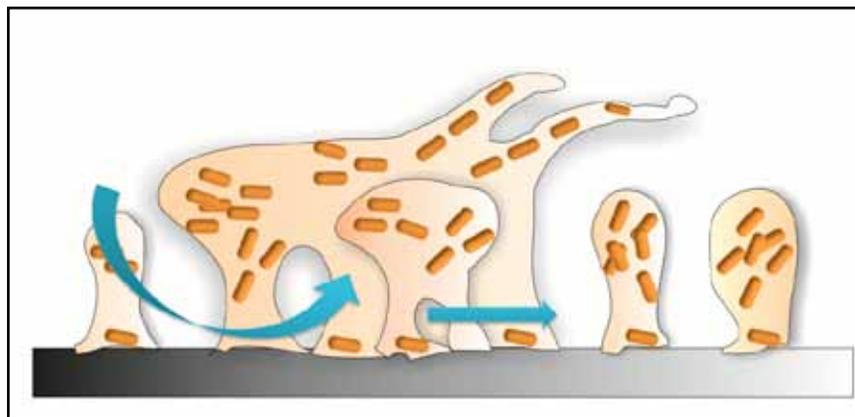


Figura 1. Estructura de un biofilm. Se ilustra la heterogeneidad de la estructura del biofilm, observándose grupos de bacterias que conforman estructuras en formas de hongos y serpentina, regiones vacías y canales de agua.

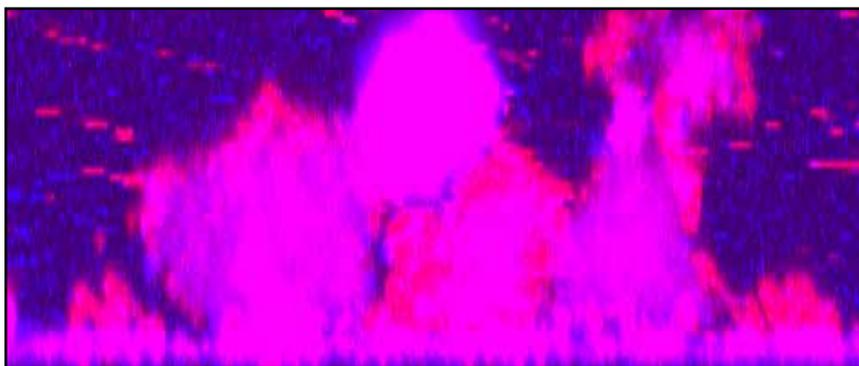


Figura 2. Imagen de estructuras en forma de hongo de un biofilm de *P. aeruginosa* capturada con un microscopio confocal. Magnificación 400X.

están caracterizadas por una asociación transitoria a una superficie seguida por una adhesión robusta. Estas etapas iniciales son aceleradas por la presencia de pili tipo IV y flagelos (estructuras filamentosas que sirven para impulsar la célula bacteriana). Una vez que se logra el contacto con la superficie, las bacterias utilizan estas estructuras para desplazarse hasta encontrar otras bacterias. Las etapas 3 y 4 involucran la agregación de las células en micro-

colonias y su posterior crecimiento y maduración, adquiriendo una estructura plana o una con forma de hongos dependiendo de la fuente de nutrientes disponible. Finalmente, la quinta etapa se caracteriza por la recuperación de la movilidad transitoria de parte de las células que integran el biofilm, las cuales son liberadas para colonizar nuevos nichos (Hall-Stoodley L., 2004).

Estudios previos indicaron que un proceso de comunicación entre bacterias denominado *Quorum Sensing* (QS) influye la formación de la estructura del biofilm en distintas especies (Parsek M.R., 2005). El QS se desencadena cuando las bacterias detectan alteraciones en el ambiente, como un cambio de pH, de osmolaridad, disponibilidad de nutrientes o densidad poblacional, y comienzan a secretar un tipo de moléculas que actúan como señal, denominadas autoinducidas. Cuando éstas se acumulan en cantidad suficiente (lo cual está relacionado con la densidad poblacional) conducen al encendido de ciertos genes que producen una respuesta concertada en toda la población de bacterias. Las acil-homoserinlactonas (acil-HSL, en particular la N-3-oxododecanoil-homoserinlactona y la butiril-homoserinlactona) son las moléculas autoinducidas mejor descritas de un grupo de especies de bacterias clasificadas como Gram

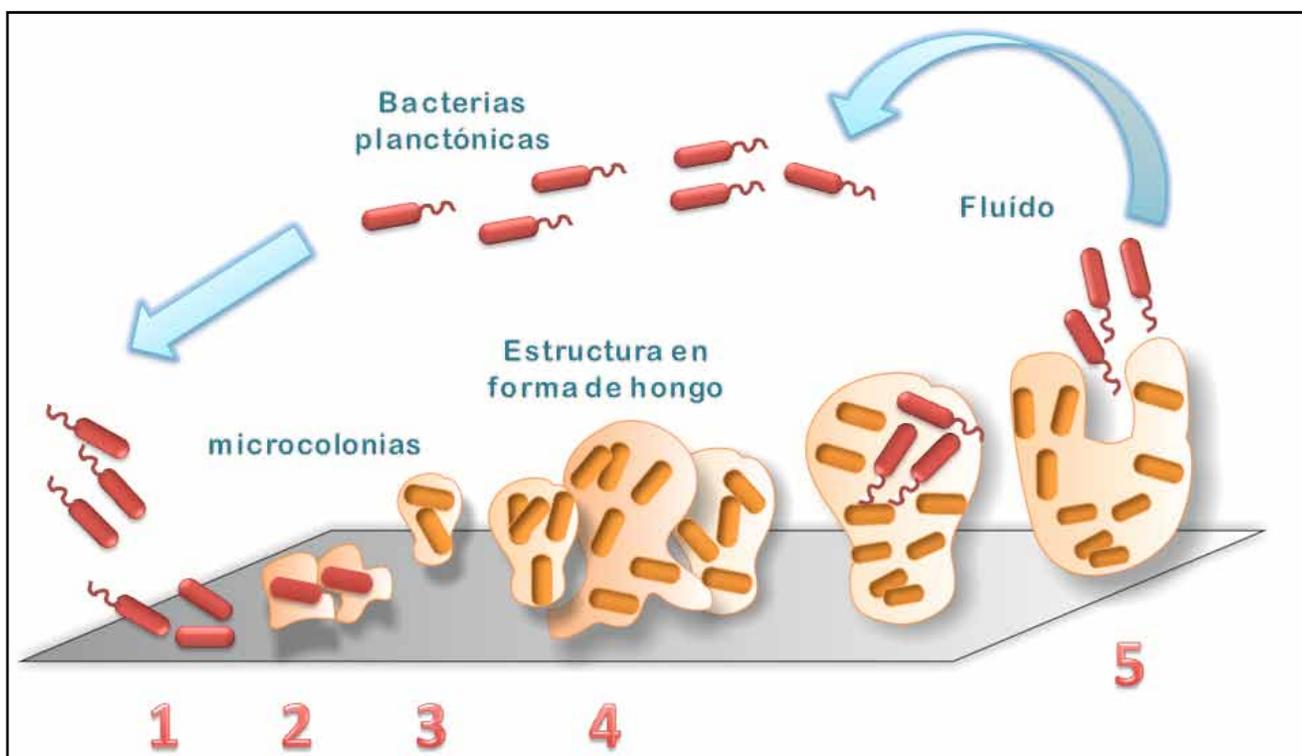


Figura 3. Formación y ciclo de vida de un biofilm. Etapa 1: células individuales colonizan la superficie; 2: se producen sustancias poliméricas extracelulares y la adhesión se torna irreversible; 3 y 4: se desarrolla la arquitectura del biofilm y madura; y 5: células individuales son liberadas del biofilm, las cuales pueden colonizar nuevos nichos.

negativas, entre ellas, *P. aeruginosa*. Las cepas de *P. aeruginosa* incapaces de producir acil-HSL forman biofilms en los cuales las bacterias se encuentran empaquetadas muy cercanas unas con otras, generando así biofilms chatos que son más lábiles que los biofilms con forma de hongos. Esto se debe a que las acil-HSL regulan la producción de ramnolípidos, que son sustancias surfactantes necesarias para mantener los espacios libres entre los agregados celulares y definir las separaciones entre los pilares de bacterias que forman la estructura tridimensional del biofilm (Figura 1) (Kirisits M.J., 2006).

Los biofilms se encuentran muy extendidos en la naturaleza. ¿Qué ventajas representa para las bacterias la formación de biofilms? En primer lugar, las superficies proveen cierto grado de estabilidad en el medio y pueden presentar funciones catalíticas al localizar a las células próximas unas de otras. Por otra parte, la formación de biofilms provee protección frente a múltiples desafíos ambientales como la exposición a rayos UV, la toxicidad por metales, la deshidratación y la salinidad, la fagocitosis, los antibióticos y los agentes antimicrobianos (Hall-Stoodley L., 2004). Finalmente, la matriz extracelular podría ayudar a captar y concentrar minerales esenciales y nutrientes del medio circundante (del Pozo J.L., 2007).

■ CONSECUENCIAS DEL CRECIMIENTO EN MODO BIOFILM

El desarrollo de biofilms tiene consecuencias importantes en la salud humana y también en diversas industrias (por ejemplo, en la industria alimentaria o cosmética).

Los biofilms pueden resultar altamente perjudiciales en la industria, pudiendo ocasionar la reducción en el flujo de agua, aceite o cual-

quier otro líquido que circule a través de tuberías, además de acelerar la corrosión de los propios tubos. También inician la degradación de los objetos sumergidos, tales como componentes estructurales de plataformas petrolíferas, barcos e instalaciones costeras. Asimismo la calidad de agua potable puede verse amenazada por los biofilms que se forman en los conductos de distribución. Aunque las bacterias que se encuentran en los conductos de agua son en su mayoría inocuas, la cloración estándar podría ser insuficiente para matarlas. La liberación periódica de células podría llevar a brotes de enfermedad. Existe preocupación por la posibilidad de que *Vibrio cholerae*, el agente causante del cólera, pueda ser dispersado de esta manera (Madigan M., 2003).

En cuanto a la salud humana, la relevancia de los biofilms es ilustrada claramente por observaciones

que sugieren que los biofilms están presentes en más del 60% de todas las infecciones bacterianas (del Pozo J.L., 2007). Sin embargo, el impacto de estas comunidades bacterianas en enfermedades infecciosas puede aún estar siendo subestimado debido a la dificultad para diagnosticar su presencia como resultado de la diversidad de microorganismos involucrados y de los distintos nichos que pueden infectar en el huésped.

Los biofilms son cruciales en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas crónicas y subagudas, tales como infecciones por *P. aeruginosa* en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, en los cálculos renales infecciosos, en endocarditis bacterianas, así como también en infecciones en prótesis e implantes médicos (Parsek M.R., 2003). Recientemente, se ha comprobado que los biofilms también están involucrados en las infecciones cró-

Tabla 1. Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucrados biofilms bacterianos (Costerton J.W., 1999).	
Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora del biofilm
Neumonía por fibrosis quística	<i>P. aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Endocarditis de válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo viridans
Caries dental	Cocos Gram positivos acidogénicos (ej: <i>Streptococcus</i>)
Infecciones nosocomiales	
Neumonía	Bacilos Gram negativos
Vías arteriovenosas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
Dispositivos ortopédicos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Lentes de contacto	<i>Pseudomonas P aeruginosa</i> y cocos Gram positivos

nicas de quemaduras. En todos los casos, las infecciones mediadas por biofilms comprometen la calidad de vida y pueden estar asociadas a una mayor mortalidad. La tabla 1 detalla una lista de las infecciones humanas en las que han sido implicados los biofilms.

Las infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* son responsables de la alta morbilidad y mortalidad que afectan a la gran mayoría de los pacientes con fibrosis quística. La fibrosis quística es la enfermedad hereditaria fatal más común en la población caucásica, afectando a 1 de cada 2.500 nacimientos. La fibrosis quística es causada por mutaciones recesivas en el gen que codifica para un canal para el transporte de iones cloruro a través de la membrana plasmática, expresado en el epitelio de múltiples órganos. Los pacientes con esta patología desarrollan una enfermedad multiorgánica que afecta principalmente a los pulmones dando lugar a una falla respiratoria que eventualmente conduce a la muerte (Hassett D.J., 2010). La enfermedad pulmonar en estos pacientes se debe a infecciones recurrentes que resultan en una inflamación crónica, presencia de un moco espeso en las vías respiratorias, bronquiectasia (destrucción y ensanchamiento de las vías respiratorias mayores) y neumonía. Las inflamaciones recurrentes exacerbadas en los pulmones son la causa de las hospitalizaciones frecuentes y de la declinación en la función pulmonar que conduce, en última instancia, a la falla respiratoria (Hassett D.J., 2010). Durante la infancia estos pacientes se infectan principalmente con *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae*, pero en pacientes de mayor edad la infección predominante es mediada por *P. aeruginosa* (Hassett D.J., 2010). Esta bacteria posee una enorme flexibilidad genética y metabólica que le

permite adaptarse al entorno y persistir dentro de las vías respiratorias de estos pacientes. Los genotipos y fenotipos de las cepas presentes en estadios tardíos de la enfermedad difieren sustancialmente de aquellos que inicialmente colonizan los pulmones (Smith E.E., 2006). De hecho, la conversión de *P. aeruginosa* de un fenotipo no mucoide a uno mucoide, caracterizado por una sobreproducción del exopolisacárido alginato, marca la transición a un estadio más persistente, caracterizado por resistencia a antibióticos y una declinación pulmonar acelerada (Gomez M.I., 2007).

Los biofilms también se encuentran implicados en el desarrollo de endocarditis de válvulas nativas, es decir, en la inflamación del endocardio (revestimiento interno de las válvulas cardíacas). Estas complicaciones resultan de la interacción de los microorganismos con las válvulas mitral, aorta, tricúspide o pulmonar. Los estreptococos y estafilococos son generalmente los responsables de estas infecciones, llegando al torrente sanguíneo desde la orofaringe, el tracto gastrointestinal o el tracto genitourinario. Estas bacterias normalmente no se adhieren sobre las válvulas intactas; sin embargo, si se produce alguna lesión sobre las mismas, las células endoteliales secretan fibronectina, que es utilizada como receptor por adhesinas específicas de la superficie de las bacterias. Como consecuencia, las bacterias se multiplican en la lesión y terminan formando el biofilm (Lasa I., 2005). Este biofilm interfiere en la función de la válvula, causando pérdidas cuando la válvula está cerrada y turbulencias y un flujo disminuido cuando está abierta. Además, el biofilm constituye una fuente continua de infección hacia el torrente sanguíneo, que persiste aún bajo tratamiento antibiótico. Por último, trozos del biofilm pueden despren-

derse y provocar embolias sépticas (Parsek M.R., 2003).

Los biofilms son difíciles de erradicar porque son resistentes a biocidas, antibióticos y a la respuesta inmune del huésped. Particularmente, las bacterias asociadas a los biofilms exhiben un tipo de tolerancia a antibióticos que es distinta a la resistencia a antibióticos convencional ya que no es debida a mecanismos genéticos básicos (mutación génica o transferencia horizontal), sino que está determinada por este modo particular de crecimiento (del Pozo J.L., 2007). Se ha planteado una variedad de mecanismos potenciales que podrían dar cuenta de la resistencia a microbicidas exhibida por los biofilms. Entre ellos, se propuso que la matriz extracelular asociada con los biofilms restringiría la penetración de agentes antimicrobianos. Este postulado puede ser aplicado a los aminoglicósidos, un grupo de antibióticos que incluye a la gentamicina, para los cuales componentes de la matriz como el alginato y el ADN podrían actuar con una barrera, pero no las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y la levofloxacina, que no tienen disminuida su capacidad de difundir al interior el biofilm (Rybtke M.T., 2011). No obstante, la alta densidad de organismos del biofilm resulta en la acumulación de desechos (productos del metabolismo bacteriano) que en última instancia alteran al microambiente local, hecho que podría comprometer la acción de los antibióticos en el interior del biofilm. Además, los agentes antimicrobianos pueden ser atrapados en la matriz donde son secuestrados por enzimas que los inactivan. Por otro lado, en la profundidad del biofilm existe una fracción de células que se encuentran en un estado quiescente. Dado que la mayoría de los agentes antimicrobianos actúan sobre las células que se encuentran en división, éstos no

resultan efectivos para destruir a la totalidad de las bacterias del biofilm. Además, las bacterias en los biofilms pueden incrementar la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés, lo que las convierte en más resistentes a la acción de los agentes antimicrobianos. Por último, los biofilms pueden complicar aún más la situación al facilitar la diseminación de resistencias antimicrobianas convencionales por transferencia génica horizontal (del Pozo J.L., 2007).

Por estos motivos, las estrategias tradicionales de combate frente a infecciones bacterianas resultan ineficientes cuando éstas son mediadas por biofilms. Actualmente se están evaluando diversas estrategias terapéuticas alternativas que incluyen el desarrollo de moléculas que afecten la comunicación célula-célula, sustancias que despolimerizan la matriz extracelular, tratamientos empleando bacteriófagos, métodos físicos y el empleo de combinaciones de antibióticos que sean eficientes frente a esta forma de crecimiento bacteriano (del Pozo J.L., 2007).

Aunque generalmente los biofilms bacterianos son asociados con procesos infecciosos, algunos biofilms tienen un papel protector. Los biofilms formados por lactobacilos presentes en la vagina fermentan el glucógeno producido por las células epiteliales al ser inducidas por los estrógenos, produciendo ácidos que disminuyen el pH vaginal y previenen de esa manera la colonización por microorganismos patógenos. La desaparición de este biofilm con la consiguiente neutralización del pH suele venir acompañada del desarrollo de vaginosis bacterianas, como las ocasionadas por microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis* (Lasa I., 2005). Otro ejemplo de biofilms beneficiosos son aquéllos formados sobre la superficie de los dientes, que protegen frente a la colonización por otros pa-

tógenos exógenos. Este biofilm suele estar compuesto por 20-30 especies bacterianas distintas, entre las que invariablemente destacan en número los estreptococos y *Actinomyces spp.* Las bacterias de la placa dental viven en equilibrio mientras las condiciones externas se mantengan constantes. Una persona que consume muchos alimentos o bebidas ricas en azúcares, favorecerá el desarrollo de especies bacterianas que fermentan los azúcares, provocando un descenso en el pH. Esto actuará desequilibrando la población bacteriana permitiendo el mayor desarrollo de especies como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*, que producen gran cantidad de ácidos que disuelven el esmalte protector de los dientes (Lasa I., 2005; Burne, 2000). La consecuencia final es el desarrollo de las dos infecciones más prevalentes en el hombre, la caries y la periodontitis.

■ LA RESPUESTA INMUNE AL BIOFILM

El sistema inmune opera a través de dos brazos efectores, uno conocido como sistema inmune innato y el otro como sistema inmune adaptativo (Faimboin L., 2011). La respuesta innata constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones, y a su vez controla el inicio de las respuestas adaptativas. Las respuestas innatas son activadas tras el reconocimiento de estructuras moleculares que se encuentran presentes sólo en los patógenos y están ausentes en nuestro propio organismo. Estas estructuras se conocen como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PMAP) y en general, son compartidas por grandes grupos de microorganismos. Un ejemplo lo constituye el lipopolisacárido (LPS) presente en todas las bacterias Gram negativas. Estos (PMAP) son reconocidos a través de Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRP) que se expresan mayoritariamente en las

células de la inmunidad innata, como ser macrófagos y neutrófilos. De este modo, los componentes del sistema inmune innato son capaces de discriminar la presencia de un organismo invasor. Por el contrario, los componentes del sistema inmune adaptativo reconocen entidades moleculares expresadas por cada patógeno en particular, a las cuales se las denomina antígenos. La respuesta adaptativa involucra la participación de linfocitos T y B. La activación de linfocitos B tras el reconocimiento de un antígeno presente, por ejemplo, en una determinada bacteria, conduce a la secreción de anticuerpos dirigidos contra ese antígeno, capaces de unirse a la bacteria y desencadenar mecanismos que llevan a su destrucción. La activación de los linfocitos T tras el reconocimiento de un antígeno bacteriano, por otra parte, conduce a la generación de linfocitos T con perfiles funcionales característicos que intentarán erradicar el proceso infeccioso. Se han descrito distintos perfiles de linfocitos T efectores tales como los linfocitos T CD4 Th1, Th2, Th17, Th3, T regulatorios y los linfocitos T CD8 citotóxicos, los cuales desempeñan distintas funciones. Un perfil o conjunto de perfiles de linfocitos son generados dependiendo de la naturaleza del microorganismo invasor involucrado.

Las estrategias del sistema inmune innato frente a una infección bacteriana involucran la acción de células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos. Estos leucocitos capturan a las bacterias dentro de vesículas fagocíticas o fagosomas y las destruyen a través de la acción de dos sistemas microbicidas (Kantari C., 2008). Uno de estos sistemas microbicidas involucra la participación de la enzima NADPH oxidasa que se encarga de producir anión superóxido, molécula a partir de la cual se generan otras especies que en conjunto reciben el nombre de In-

termediarios Reactivos del Oxígeno (IRO), como el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), el hipoclorito (componente activo de la lavandina que usamos en nuestros hogares) y otros oxidantes, algunos de larga vida media como las cloraminas. El otro sistema microbicida incluye enzimas que degradan componentes bacterianos como las proteasas elastasa, catepsina G y proteinasa 3. La elastasa y la proteinasa 3 cortan a una variedad de proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno tipo IV, y es por ello que, más allá de su acción sobre los componentes de los microorganismos, cuando estas proteasas son liberadas al medio extracelular están implicadas en el daño a tejidos inflamados. Este sistema microbicida también involucra a las defensinas, péptidos antibióticos pequeños y altamente catiónicos que actúan induciendo permeabilización de las membranas microbianas (Kantari C., 2008).

Estudios recientes demostraron que los neutrófilos también pueden responder a la infección liberando su material genético (cromatina) al medio extracelular conjuntamente con parte del contenido de sus gránulos lisosomales como enzimas y proteínas catiónicas asociadas. Estas redes de cromatina y componentes granulares reciben el nombre de trampas extracelulares del neutrófilo pues ellas atrapan a los microorganismos y contribuyen a la destrucción de los mismos en el medio extracelular (Brinkmann V., 2004).

■ ¿DE QUÉ MODO NUESTRO SISTEMA INMUNE NOS DEFIENDE FRENTE A UN BIOFILM BACTERIANO?

Los neutrófilos probablemente constituyan uno de los componentes más importantes de la respuesta inmune montada frente a las infecciones mediadas por biofilms (Jesai-

tis A.J., 2003). A esta respuesta también contribuyen los macrófagos. Ambos tipos de células fagocíticas se activan tras detectar la presencia de LPS, lipoproteínas bacterianas y otros PMAP en las bacterias que forman el biofilm. Este reconocimiento está mediado por RRP, entre los que se encuentran los receptores de tipo Toll o TLR (del inglés *Toll like receptors*), los receptores como lectinas de tipo C, los receptores *scavenger* y los receptores de tipo NOD o NLR (del inglés, *NOD like receptors*). Las células fagocíticas también pueden reconocer sobre las bacterias fragmentos derivados del complemento, un sistema proteico plasmático que se activa frente a diversas infecciones bacterianas. La activación del complemento conduce a la deposición de componentes como el C3b y el C3bi sobre la superficie bacteriana, los cuales son reconocidos por receptores específicos presentes en los fagocitos. La presencia de anticuerpos unidos a las bacterias también contribuye al reconocimiento, debido a que las células fagocíticas presentan receptores específicos para ellos (Faimboin L., 2011).

El reconocimiento de las bacterias a través del conjunto de receptores antes mencionado no sólo dispara su fagocitosis, sino también la secreción de mediadores proinflamatorios como citoquinas y quimiocinas (citoquinas quimiotácticas) cuya misión consiste en controlar o contener la infección, así como también condicionar la ulterior respuesta adaptativa (Kantari C., 2008). Una de las quimiocinas de mayor relevancia en los procesos inflamatorios desencadenados por infecciones bacterianas es la IL-8 (interleuquina 8). Esta molécula es producida por una amplia variedad de células (monocitos, macrófagos, neutrófilos, queratinocitos y células endoteliales, entre otras) y tiene la capacidad de atraer a los neutrófilos, guiados por un gradiente de concentración,

al foco de infección, contribuyendo también a su activación. A su vez, los neutrófilos activados son capaces de producir grandes cantidades de IL-8, hecho que posibilita, conjuntamente con la IL-8 producida por otros tipos celulares en el foco de infección, el reclutamiento masivo de neutrófilos y la perpetuación del proceso inflamatorio para intentar erradicar la infección (Scapini P., 2000). La IL-1 β es otra citoquina clave en la respuesta inflamatoria del huésped. La IL-1 β liberada causa la acumulación de metabolitos del ácido araquidónico, incrementa los niveles de la óxido nítrico (NO) sintasa inducible y mantiene la producción de NO, induciendo la inflamación. Asimismo, incrementa la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, promueve la salida de leucocitos desde los vasos sanguíneos al foco infeccioso, modula el metabolismo muscular e induce fiebre (Dinarello C.A., 2002).

A pesar de que muchas de las acciones que el sistema inmune pone en marcha a fin de defendernos frente a la infección por biofilms son activadas por los mismos componentes presentes en las bacterias planctónicas o libres, hoy sabemos que algunos componentes característicos del biofilm constituyen señales que alertan al sistema inmune de la presencia de bacterias desarrollándose con este modo de crecimiento y ponen en marcha mecanismos para su erradicación.

¿Cuáles son los componentes privativos de los biofilms que activan al sistema inmune? Se sabe que la N-3-oxododecanoil-homoserinlactona induce el reclutamiento de los neutrófilos al biofilm (Zimmermann S., 2006), incrementa la expresión en la superficie de los neutrófilos de la integrina CD11b/CD18, una molécula muy relevante tanto para la migración del neutrófilo desde los vasos sanguíneos al foco infeccio-

so, como para el reconocimiento y fagocitosis de bacterias que exhiben componentes del sistema complemento adherido a su superficie. La N-3-oxododecanoil-homoserinlactona también aumenta la expresión de receptores para anticuerpos que facilitan la fagocitosis de bacterias recubiertas (opsonizadas) con anticuerpos que han reconocido a antígenos sobre su superficie (Wagner C., 2007). Por otra parte, estudios realizados por nuestro grupo evidenciaron que el ADN de la matriz del biofilm es un componente proinflamatorio relevante ya que estimula la fagocitosis de las bacterias por los neutrófilos, la secreción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y la IL-8 y la liberación de trampas extracelulares (Fuxman Bass J.I., 2010).

Los mecanismos efectores ejecutados por los neutrófilos resultan cruciales en la defensa frente a las infecciones mediadas por biofilms. Si esta respuesta resulta en una limitación de la infección, la acumulación de neutrófilos cesa y cobran relevancia otros tipos celulares como macrófagos y fibroblastos que contribuyen a resolver la inflamación. Por el contrario, si el sistema innato del huésped no logra controlar la infección, la acumulación de neutrófilos se prolonga y se activa una respuesta adaptativa cuyo objetivo será la erradicación de la infección. Esta respuesta involucra la producción de anticuerpos, que usualmente resultan ineficientes para eliminar al patógeno, puesto que tienen dificultades para penetrar en la matriz del biofilm y sólo se unen a las bacterias periféricas del mismo (de Beer D., 1997). Los anticuerpos tampoco logran contribuir a la muerte bacteriana por fagocitosis (Cerca N., 2006). No obstante, los anticuerpos contra moléculas de la superficie bacteriana podrían cumplir un rol en impedir la formación de nuevos

biofilms al interferir con la adhesión de las bacterias a superficies (Tashiro Y., 2008).

A pesar de que el huésped pone en marcha la activación del sistema inmune a fin de erradicar al biofilm, dada la persistencia de este tipo de infecciones es evidente que la respuesta en muchas ocasiones no es eficiente para combatirlos, e incluso en algunos casos, como en las infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* en los pacientes con fibrosis quística, la activación inmune desmedida conduce a acrecentar la patología.

■ ¿POR QUÉ RAZÓN AÚN CUANDO EL SISTEMA INMUNE REACCIONA FRENTE A UNA INFECCIÓN POR UNA BACTERIA CRECIENDO EN BIOFILM EN GENERAL NO LOGRA ERRADICARLA?

Muchas son las causas que pueden contribuir a la persistencia del biofilm. Algunas de estas causas han comenzado a conocerse. Entre ellas, existen causas inherentes al modo de crecimiento en comunidades: en primer lugar, los neutrófilos no suelen tener capacidad de penetrar la matriz del biofilm, permaneciendo en la superficie y en los canales del mismo. Además, estas células no son capaces de fagocitar a la masa de bacterias inmersas en la matriz extracelular que constituye el biofilm, sólo fagocitando aquellas presentes en la superficie de esta comunidad (Figura 4) (Jesaitis A.J., 2003). El intento fallido de fagocitosis de bacterias incluidas en la matriz extracelular resulta en la secreción de parte del contenido de sus gránulos al medio extracelular, liberando proteasas que actúan sobre el biofilm pero también sobre los propios tejidos del huésped, induciendo daño colateral.

Otros factores que contribuyen a la persistencia del biofilm consisten en componentes del mismo que permiten a la bacteria evadir la acción del sistema inmune del huésped. Así por ejemplo, el exopolisacárido de *P. aeruginosa* inhibe el reclutamiento de los neutrófilos, mientras que el de *Streptococcus mutans* es capaz de inhibir la fagocitosis y la producción de IRO, afectando la capacidad de los neutrófilos de eliminar a las bacterias (Munro C.L., 1993; Stiver, 1988). Evidencias adicionales demostraron que la intensidad de la producción de IRO por biofilms es menor que la inducida por bacterias creciendo en forma planctónica (Jesaitis A.J., 2003). Trabajos realizados con mutantes deficientes en señales de QS demostraron que estas moléculas inhiben la producción de los IRO por los neutrófilos (Bjarnsholt T., 2005). Por otra parte, los biofilms de *Pseudomonas* liberan ramnolípidos, sustancias detergentes cuya síntesis es regulada por señales de QS, que inducen la muerte por necrosis de los neutrófilos (Bjarnsholt T., 2005). De hecho, aún cuando algunas señales de QS han sido propuestas como inductoras del reclutamiento de neutrófilos al sitio donde está el biofilm, una vez que éstos arriban, son en parte eliminados por acción de los ramnolípidos. Merece destacarse, sin embargo, que las se-

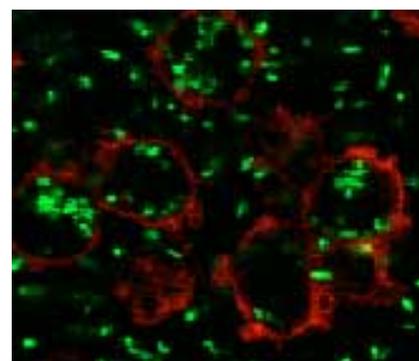


Figura 4. Imagen de neutrófilos (rojos) depositados sobre un biofilm de *P. aeruginosa* conteniendo bacterias fagocitadas (verdes) en su interior. Magnificación: 600X.

ñales de QS son susceptibles a degradarse por acción de una lactonasa epitelial, por lo cual, el resultado final dependerá de la contribución de cada uno de estos mecanismos. Consecuentemente, la muerte de los neutrófilos al acudir al biofilm los transforma en un arma de doble filo, ya que ellos mismos al morir liberan ADN y F-actina, las cuales proveen una matriz que favorece el desarrollo del biofilm (Walker T.S., 2005).

■ LA ACTIVACIÓN INMUNE DESMEDIDA FRENTE A UN BIOFILM BACTERIANO CONTRIBUYE AL DAÑO TISULAR.

En las infecciones mediadas por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, la activación exacerbada del sistema inmune del huésped contribuye a la patología. Los neutrófilos reclutados en el sitio de crecimiento del biofilm se activan y destruyen a las bacterias de su parte superficial pero no logran eliminarlo. La activación de los neutrófilos conduce a la liberación al medio extracelular de proteasas, IRO y trampas extracelulares, que acrecientan el daño tisular. La abundante liberación de trampas extracelulares de neutrófilos que es inducida por el ADN extracelular de los biofilms, podría contribuir a aumentar la viscosidad del moco en los pulmones (Fuxman Bass J.I., 2010). Por otra parte, las bacterias del biofilm que resisten a la acción microbicida de los fagocitos pueden sufrir mutaciones ocasionadas por los IRO liberados por la activación de la NADPH oxidasa, que podrían contribuir a la aparición de variantes bacterianas más virulentas (Mathee K., 1999). En conjunto, esta respuesta inflamatoria acompañada de daño tisular favorecería el deterioro de la función pulmonar característico de la fibrosis quística.

■ CONCLUSIONES FINALES

El huésped es capaz de responder a la presencia de una bacteria creciendo en modo biofilm, sin embargo, este modo de crecimiento impone al sistema inmune diversos mecanismos de evasión de su acción. El resultado final, defensa exitosa o adaptación de la bacteria a sobrevivir en el huésped, dependerá del balance entre las acciones del sistema inmune para eliminar a las bacterias y aquéllas impuestas evolutivamente por las bacterias para soportar la acción del sistema inmune. A juzgar por la persistencia de este tipo de infecciones, en muchas ocasiones el biofilm logra superar la acción del sistema inmune del huésped. La dificultad para erradicar las infecciones persistentes mediadas por biofilms bacterianos a pesar de la aplicación de terapias antibióticas agresivas, pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el control y prevención de este tipo de infecciones. Los recientes avances en el entendimiento de las bases genéticas y moleculares del crecimiento bacteriano en comunidades y su interacción con el sistema inmune del huésped han identificado distintos blancos terapéuticos que pusieron en marcha investigaciones para contribuir a lograr dicho objetivo.

■ BIBLIOGRAFÍA

Bjarnsholt T., Jensen P.O., Burmolle M., Hentzer M., Haagensen J.A., Hougen H.P., Calum H., Madsen K.G., Moser C., Molin S., Hoiby N., Givskov M. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* 151.373-383.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann

Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303.1532-1535.

Cerca N., Jefferson K.K., Oliveira R., Pier G.B., Azeredo J. (2006) Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect Immun* 74.4849-4855.

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284.1318-1322.

de Beer D., Stoodley P., Lewandowski Z. (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol Bioeng* 53.151-158.

del Pozo J.L., Patel R. (2007) The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 82.204-209.

Dinarello C.A. (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20.S1-13.

Faimboin L., Geffner J. 2011. Introducción a la Inmunología humana. Editorial Panamericana, Buenos Aires.

Fuxman Bass J.I., Russo D.M., Gabeillon M.L., Geffner J.R., Giordano M., Catalano M., Zorreguieta A., Trevani A.S. (2010) Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Immunol* 184.6386-6395.

Gomez M.I., Prince A. (2007) Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 7.244-251.

- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2.95-108.
- Hassett D.J., Korfhagen T.R., Irvin R.T., Schurr M.J., Sauer K., Lau G.W., Sutton M.D., Yu H., Hoiby N. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opin Ther Targets* 14.117-130.
- Jesaitis A.J., Franklin M.J., Berglund D., Sasaki M., Lord C.I., Bleazard J.B., Duffy J.E., Beyenal H., Lewandowski Z. (2003) Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* 171.4329-4339.
- Kantari C., Pederzoli-Ribeil M., Witko-Sarsat V. (2008) The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol* 15.118-146.
- Kirisits M.J., Parsek M.R. (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol* 8.1841-1849.
- Lasa I., del Pozo J., Penadés J., Leiva J. (2005) Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28.163-175.
- Madigan M., Martinko J., Dunlap P., Clark D. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación.
- Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum P.W., Campbell J.I., Jensen P., Johnsen A.H., Givskov M., Ohman D.E., Molin S., Hoiby N., Kharazmi A. (1999) Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145 (Pt 6).1349-1357.
- McDougald D., Rice S.A., Barraud N., Steinberg P.D., Kjelleberg S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10.39-50.
- Munro C.L., Macrina F.L. (1993) Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis. *Mol Microbiol* 8.133-142.
- O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54.49-79.
- Parsek M.R., Greenberg E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13.27-33.
- Parsek M.R., Singh P.K. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57.677-701.
- Rybtke M.T., Jensen P.O., Hoiby N., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T. (2011) The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10.141-157.
- Scapini P., Lapinet-Vera J.A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M.A. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177.195-203.
- Smith E.E., Buckley D.G., Wu Z., Saenphimmachak C., Hoffman L.R., D'Argenio D.A., Miller S.I., Ramsey B.W., Speert D.P., Moskowitz S.M., Burns J.L., Kaul R., Olson M.V. (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.8487-8492.
- Tashiro Y., Nomura N., Nakao R., Senpuku H., Kariyama R., Kumon H., Kosono S., Watanabe H., Nakajima T., Uchiyama H. (2008) Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190.3969-3978.
- Wagner C., Zimmermann S., Brenner-Weiss G., Hug F., Prior B., Obst U., Hansch G.M. (2007) The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Anal Bioanal Chem* 387.481-487.
- Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S., Poch K.R., Lieber J.G., Saavedra M.T., Fessler M.B., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nick J.A. (2005) Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect Immun* 73.3693-3701.
- Zimmermann S., Wagner C., Müller W., Brenner-Weiss G., Hug F., Prior B., Obst U., Hansch G.M. (2006) Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* 74.5687-5692.
- Zobell C.E. (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* 46.39-56.

Bordetella pertussis, un patógeno humano que ha sobrevivido a décadas de vacunación masiva

Palabras claves: *Bordetella pertussis*, macrófagos, neutrófilos, inmunoevasión, persistencia
Key words: *Bordetella pertussis*, macrophages, neutrophils, immune evasion, persistence

Bordetella pertussis es el agente causal de la tos convulsa, una enfermedad infecciosa reemergente. La introducción de la vacuna contra este patógeno redujo la incidencia de la enfermedad pero no la circulación de la bacteria en la población. Esto ha determinado que la tos convulsa continúe siendo una amenaza para la salud pública. En los años noventa hubo un resurgimiento de tos convulsa en países con altas cobertura de vacunación, incluyendo a la Argentina. En los últimos años su incidencia ha ido en aumento transformándose en la enfermedad más prevalente entre las infecciones prevenibles por vacunación. Los mecanismos por los cuales *B. pertussis* evade la eliminación inmune y causa infecciones persistentes se desconocen. Sin embargo, siendo que

se trata de un patógeno estrictamente humano, este cuadro epidemiológico sugiere la existencia de un nicho de persistencia dentro del hospedador. Nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis. Aunque la fagocitosis y la actividad bactericida de los neutrófilos es la primera línea de defensa del hospedador, *Bordetella pertussis* evade ambos mecanismos a menos que hayan anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección. Esta falla en la primera barrera de defensa posibilitaría la interacción no bactericida con macrófagos, dentro de los cuales *B. pertussis* es capaz de sobrevivir e incluso multiplicarse a resguardo de las condiciones adversas del ambiente extracelular. El descubrimiento de un mecanismo de sobrevida de estas características nos ayuda a entender la compleja epidemiología de esta enfermedad y nos proporciona información crítica para el diseño de una nueva generación de vacunas.

The gram-negative bacterium *Bordetella pertussis* is the etiologic agent of whooping cough, a reemerging infectious disease. Vaccination against *Bordetella pertussis* has resulted in a reduction of the disease incidence but the circulation of these bacteria has persisted. Despite high vaccination rates, whooping cough remains a serious threat to human health. In the 1990s, *B. pertussis* reemerged in many countries with highly vaccinated populations, including Argentina. Its incidence has been increasing in recent years, becoming the most prevalent vaccine-preventable disease. The mechanisms that allow this pathogen to evade immune clearance and to cause the extraordinarily prolonged disease known in China as Bai Ri Ke (100 day cough) are not known. However, being *B. pertussis* a strict human pathogen, this epidemiological picture suggests the existence of a niche of persistence within the human host. Our results seem to support this hypothesis. Bacterial killing by neutrophils is one of the main lines of host defense. However, *B. pertussis* is able to avoid neutrophil phagocytosis and cellular bactericidal activity unless opsonizing antibodies are present at the site of infection. The failure of this first line of defense eventually enables the non-bactericidal interaction with macrophages inside of which *B. pertussis* can survive and grow in a protected niche. The finding of this survival mechanism contributes to better understand the complex epidemiology of this disease and provides critical information for a new generation of improved vaccines.

■ INTRODUCCIÓN

La introducción de la vacuna contra la tos convulsa o coqueluche

en la década del 40 del siglo pasado vino a resolver una situación epidemiológica crítica en todo el mundo causada por una bacteria, *Bordetella*

pertussis. En la era pre-vacunal *B. pertussis* fue una de las principales causas de mortalidad infantil. Con ciclos epidémicos cada 2 a 5 años

■ María Eugenia Rodríguez

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), CONICET-Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Biotecnología Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
Calles 47 y 115. 1900 La Plata.
Bs As. Argentina
mer@quimica.unlp.edu.ar

esta enfermedad diezmo poblaciones infantiles por décadas. La introducción de la vacunación masiva durante los 1940 y 1950 disminuyó drásticamente la incidencia. Sin embargo, aunque de menor magnitud, los ciclos epidémicos nunca desaparecieron, ni siquiera en poblaciones con coberturas de vacunación cercanas al 100%. Este fue el primer indicio que la vacuna, aunque eficiente en prevenir la sintomatología de la enfermedad, no evitaba la circulación de la bacteria. El agente causal de esta enfermedad, *Bordetella pertussis*, sólo infecta al hombre y no se conoce otro reservorio ni hospedador, lo cuál sugiere que la bacteria es capaz de sobrevivir en una población vacunada.

El Calendario Nacional de Vacunación de nuestro país es similar al de otros países, y disponemos de 4 vacunas que protegen contra la tos convulsa: la pentavalente (que se administra a los 2, 4 y 6 meses); la cuádruple (que se administra a los 18 meses); la triple bacteriana celular (que se administra al ingreso escolar) y, más recientemente (a partir del año 2009) se ha incorporado la triple bacteriana acelular, que se aplica a los 11 años, al personal de salud que presta cuidado a niños menores de un año y a los convivientes de niños prematuros de bajo peso (Tabla 1).

A pesar del número de inmunizaciones que abarca este esquema de vacunación, esta enfermedad es una de las peor controladas dentro de las enfermedades prevenibles por vacunación (inmunoprevenibles). En el año 2011 en Argentina se informaron 2.946 casos confirmados, con un total de 39 casos fatales de los cuáles el 74% eran menores de 2 meses. La neumonía es la causa de la mayoría de las muertes por coque-luche, aunque también se presentan complicaciones menos frecuentes

tales como convulsiones, encefalopatías, sobreinfecciones bacterianas y afecciones asociadas a los efectos de presión por la tos paroxística severa.

■ UN POCO DE HISTORIA PROPIA Y AJENA

Con la introducción de la vacuna y la drástica disminución en la incidencia de la tos convulsa, esta enfermedad se "olvidó" durante muchos años. Inclusive en muchos países se suspendió la vigilancia activa y sólo aquéllos que siguieron notificando los casos de tos convulsa detectaron que los picos epidémicos cíclicos cada 2-5 años nunca cesaron. El resto de los países la consideró, sino erradicada, por lo menos bien controlada. Un hito que sobresalió en este período de relativa calma fue la decisión de algunos países de dejar de vacunar a su población. Esta decisión fue consecuencia de las reacciones adversas inducidas por la vacuna que estaba en uso.

Esta vacuna, compuesta por células enteras de *B. pertussis* inactivadas por calor, puede provocar reacciones adversas de distinta magnitud que van desde enrojecimiento de la piel hasta daños neurológicos severos, ocasionando incluso la muerte de 1 de cada 310.000 vacunados. El principal factor desencadenante de estos efectos nocivos es un componente tóxico de la bacteria denominado endotoxina o lipopolisacárido, que es parte integral de la pared bacteriana. Este componente es un potente activador del sistema inmune, produciendo tanto efectos deseables (como la inducción de la respuesta inmune), como indeseables (en aquellos casos descriptos más arriba).

Estas reacciones adversas y la percepción de que la bacteria había dejado de ser un problema de salud pública disminuyó la aceptación mundial de la vacuna y hubo países como Gales, Inglaterra y Japón que la sacaron de su calendario

Tabla 1.
Calendario nacional de vacunación contra *B. pertussis*.

Edad	Dosis (vacuna)
2 meses	1a dosis (DPT-Hib-HB ^a)
4 meses	2a dosis (DPT-Hib-HB ^a)
6 meses	3a dosis (DPT-Hib-HB ^a)
18 meses	Refuerzo (DPT-Hib ^b)
5-6 años	Refuerzo (DPT ^c)
11 años	Refuerzo (DTaP ^d)

aVacuna pentavalente: contra difteria, tétanos, tos convulsa, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo B

bVacuna cuádruple: contra difteria, tétanos, tos convulsa, *Haemophilus influenzae* tipo B

cVacuna triple bacteriana celular: contra difteria, tétanos, tos convulsa

dVacuna triple bacteriana acelular: contra difteria, tétanos, componentes de *B. pertussis* acelular

Fuente: Ministerio de Salud de la Nación ([www.http://msal.gov.ar/html/Site/inmunizaciones.asp](http://msal.gov.ar/html/Site/inmunizaciones.asp))

de vacunación. Esto desembocó en una epidemia entre 1977 y 1979 en los tres países mencionados (Miller & Fletcher, 1976; Watanabe & Nagai, 2005) y disparó la necesidad de buscar nuevas formulaciones vacunales protectoras que no incluyeran la endotoxina, vacunas acelulares. La primera vacuna acelular contra *B. pertussis* la introdujo Japón en 1981 (Sato *et al.*, 1984). Con una eficacia baja pero aceptable fue la base de futuras formulaciones, todas ellas basadas en la combinación de cinco proteínas bacterianas purificadas reconocidas como factores de virulencia. Las formulaciones actualmente en uso son una combinación de entre una y cinco de estas proteínas (Edwards *et al.* 1995 Gustafsson *et al.* 1996; Mattoo and Cherry, 2005). Aunque la eficacia (grado de protección) de estas vacunas demostró ser menor que la de la vacuna celular original, estas nuevas formulaciones demostraron ser mucho más seguras en lo que se refiere a efectos adversos. La mayoría de los países desarrollados comenzaron entonces a sustituir la vacuna celular, o a emplear una combinación de la vacuna celular con estas nuevas vacunas acelulares a lo largo del calendario de vacunación. Nuestro país siguió empleando solamente la vacuna celular hasta que, en el año 2009, incorporó la vacuna acelular como refuerzo adicional a los 11 años de edad (Tabla 1).

Con la introducción de la vacuna acelular se registró un aumento progresivo, lento y sostenido de la incidencia de la tos convulsa. En la década del noventa la mayoría de los países con vigilancia activa detectaron un aumento alarmante en la incidencia de la enfermedad (Andrews *et al.* 1997; Baron *et al.* 1998; de Melker *et al.* 1997; Guris *et al.* 1999, Gzyl *et al.* 2004; He & Mertsoola 2008; Hellenbrand *et al.* 2009; Nteyayabo *et al.* 2003; van Buynder

et al. 1999). A fines de esta década la tos convulsa se convirtió en la cuarta causa de mortalidad infantil por enfermedades inmunoprevenibles, siendo declarada enfermedad reemergente por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En esta misma época, Holanda alertó acerca de que las cepas circulantes en la población presentaban diferencias en las regiones inmunodominantes de las proteínas con que se habían formulado las vacunas acelulares (Mooi, *et al.* 1999). A medida que otros países investigaron las cepas circulantes en su población detectaron las mismas diferencias respecto a los componentes vacunales, sugiriendo que la vacunación masiva durante años con la misma cepa vacunal había conducido a la selección de cepas con variantes en antígenos protectores (Borisova *et al.* 2007; Byrne & Slack 2006; Cassidy *et al.* 2000; Van Loo & Mooi. 2002; Weber *et al.* 2001; Yao *et al.* 2005). Argentina reinició la vigilancia epidemiológica en el año 2002 y nuestro grupo intervino en el relevamiento. Se pudo comprobar que nuestro país no estaba ajeno a la situación epidemiológica mundial. También en Argentina los casos de tos convulsa fueron aumentando año a año. El análisis de las cepas circulantes demostró que en nuestro país también se habían seleccionado las mismas variantes que se detectaron en Europa, Estados Unidos y demás países (Fingerman *et al.* 2006). Argentina es un país relativamente aislado comparado con los países de Europa y USA en los cuáles la aparición de las mismas variantes podría deberse a la diseminación de cepas mejor adaptadas, en lugar de tratarse de selecciones simultáneas e independientes. En nuestro país, si bien la diseminación de cepas importadas no puede descartarse completamente, es muy probable que la aparición de nuevas cepas sea endógena, lo que abona a la teoría de

la selección por vacunación de este tipo de variantes. Como caso extremo de la selección o adaptación de cepas, se han aislado recientemente en Francia cepas de *B. pertussis* que han perdido la expresión de uno o más de los antígenos incluidos en la vacuna (Bouchez *et al.* 2009), poniendo en duda la eficacia de las vacunas actuales en el futuro.

Los estudios realizados hasta el momento no permiten atribuir la reemergencia a la aparición de cepas con variantes en los antígenos vacunales, pero en sí misma, la aparición de variantes antigénicas demuestra que *B. pertussis* nunca ha dejado de circular en la población, ni siquiera en poblaciones con un elevado estándar de vida y coberturas de vacunación cercanas al 100%, como es el caso de Europa, Estados Unidos y Canadá, entre otros.

■ ¿POR QUE NO HA PODIDO ERRADICARSE ESTA ENFERMEDAD?

Todavía no hay una respuesta a esta pregunta. Otras infecciosas se han podido controlar, reducir su incidencia y alargar los ciclos de aparición. En el caso de *B. pertussis* todos los intentos han fracasado. Hoy en día se habla de tasa de infección y de enfermedad, como cosas separadas. Hay un elevado número de individuos infectados (muchos de ellos asintomáticos) fundamentalmente entre adultos jóvenes, y hay quienes desarrollan la enfermedad con diferentes cuadros clínicos y pronósticos (Crowcroft & Britto 2002). A este último grupo pertenece fundamentalmente la población infantil. Si bien la vacunación reduce la incidencia de la enfermedad, ha sido muy poco efectiva en reducir la tasa de infección. Aunque la introducción de la vacuna acelular en reemplazo de la vacuna celular disminuyó las reacciones adversas

causadas por la vacunación, empeoró el cuadro epidemiológico en lo que se refiere a tasa de infección porque promueve un grado de protección menor que la vacuna celular. Desde la introducción de la vacunación, el rango etario de infección pasó de los niños a los adolescentes y adultos jóvenes. La estadística de países como Estados Unidos arroja una tasa de infección en jóvenes y adultos que varía entre 370 y 1.500 infectados por cada 100.000 habitantes. Este corrimiento en el rango etario se ha explicado como una consecuencia de que la inmunidad conferida por vacunación o infección tiene una duración corta que no llega a 8 años. Adolescentes y adultos que han perdido la inmunidad conferida por vacunación son nuevamente susceptibles a la colonización y hoy se reconoce que es en esta población en la que la bacteria circula y persiste (De Serres *et al.* 2000; Hewlett & Edwards 2005). La infección en adultos suele pasar desapercibida porque se manifiesta, en la mayoría de los casos, como una tos persistente que no se diagnostica. Por ello, los adolescentes y los adultos son la fuente de infección más peligrosa para la población infantil en riesgo (von König *et al.* 2002; Senanayake *et al.* 2007). En un intento por controlar la circulación de la bacteria se han incluido varias dosis acelulares a adultos en otras partes del mundo. En Argentina, como ya se mencionó, se agregó una dosis de vacuna acelular a los 11 años, se decidió vacunar al personal de salud que presta cuidado a niños menores de un año, a los convivientes de niños prematuros de menos de 1,5 kg de peso, y a mujeres embarazadas. Sin embargo, aún deben desarrollarse vacunas que sean eficientes no sólo para controlar la sintomatología de la enfermedad sino también para evitar la colonización y lograr la erradicación del patógeno. Se sabe que *B. pertussis* es una bacteria muy lábil, incapaz

de sobrevivir fuera del hombre, de lo que se especula que hay un nicho de persistencia dentro del hospedador que deberá eliminarse.

Desde hace algunos años estamos tratando de responder estos interrogantes y hemos obtenido resultados que podrían ayudar al diseño de mejores estrategias terapéuticas y preventivas aportando al diseño de vacunas más efectivas.

■ ¿EXISTEN NICHOS DE PERSISTENCIA DENTRO DEL HOMBRE?

Para responder esta pregunta es necesario conocer las características de la interacción patógeno-hospedador. El ciclo infeccioso según se ha descrito consiste de una etapa de adhesión al epitelio respiratorio a través de adhesinas, una etapa de multiplicación sobre el epitelio, y la eventual liberación de toxinas que son, en su mayoría, las responsables de los síntomas de la enfermedad y actúan sobre algunos factores del sistema inmune favoreciendo la sobrevivencia bacteriana en la etapa inicial de colonización. Cuando los síntomas comienzan, la bacteria ya no se puede aislar con métodos convencionales de hisopado y cultivo, por lo que durante muchos años se aceptó que el hospedador la elimina en este corto plazo. Por muchos años se ha aceptado que *B. pertussis* es una bacteria exclusivamente extracelular, que transcurre todo el ciclo infeccioso adherida al epitelio respiratorio. Sin embargo, ciertos aspectos de la clínica y la epidemiología de esta enfermedad, así como ensayos de inmunidad protectora en animales desafían este paradigma. Por el contrario, la clínica y la epidemiología son compatibles con mecanismos de evasión de la respuesta inmune como los que se observan en patógenos intracelulares. Por otro lado, la capacidad de este patógeno de causar infecciones con

sintomatología leve que perdura por semanas en adultos sugiere que esta bacteria es capaz de sobrevivir a la respuesta innata del hospedador. Basados en estas observaciones estudiamos la interacción de *B. pertussis* con dos tipos de células del sistema inmune importantes en el sitio de infección, tales como los neutrófilos (granulocitos polimorfonucleares o PMN) y los macrófagos. Los neutrófilos son células fagocíticas con gran capacidad bactericida que constituyen una primera línea de defensa del hospedador. Los macrófagos son también células fagocíticas con una capacidad bactericida menor pero críticas en la orquestación de la respuesta inmune. Algunos patógenos bacterianos encuentran un nicho de persistencia dentro de las células del hospedador, y los macrófagos son una de las células blanco para este tipo de bacterias. Este no es un mecanismo general entre las bacterias de vida libre, pero aquellas que tienen una fase intracelular a lo largo del ciclo infeccioso tienen más posibilidades de persistir en el hospedador y son, en general, de difícil erradicación. Esta sobrevivencia intracelular requiere que la bacteria sea capaz no solo de evitar su propia destrucción sino también la destrucción de la célula que la está hospedando. Los resultados que obtuvimos en nuestro grupo de trabajo indican que *B. pertussis* dispone de mecanismos de este tipo. Comprobamos que en huéspedes no inmunes o con inmunidad reducida, es decir, con bajo título de anticuerpos (como es el caso de la mayor parte de la población adulta a menos que hayan estado infectados recientemente), los neutrófilos no son capaces de capturar y destruir eficientemente estas bacterias (Rodríguez *et al.* 2001). Sólo la presencia de anticuerpos específicos contra determinados antígenos bacterianos de membrana externa (y sólo uno de ellos está incluido en las vacunas actuales) aseguran que

el neutrófilo capture eficientemente a esta bacteria a través de receptores de anticuerpos que inducen su activación y el tránsito de la bacteria al lisosoma donde es destruida (Rodríguez *et al.* 2001, Hellwig *et al.* 2003). Por el contrario en ausencia de anticuerpos específicos en el sitio de interacción bacteria-PMN, la proporción de bacterias capturadas es baja y la fagocitosis de las mismas no activa al neutrófilo, lo cual facilita la supervivencia de la bacteria aún dentro de fagocitos profesionales permaneciendo viable dentro de fagosomas con características de endosomas tempranos. La interacción bacteria-PMN en ausencia de anticuerpos se produce a través de receptores celulares que se encuen-

tran inmersos en balsas lipídicas y la interacción a través de estas balsas sería la responsable del tránsito de la bacteria hacia compartimientos intracelulares en los que la bacteria no es destruida (Lamberti *et al.* 2008). Estos resultados sugieren que las bacterias que ingresen en un huésped en el cual no hay anticuerpos específicos podrán sortear el primer gran obstáculo que representan estas células centinelas. Con esta ventaja, las bacterias serán capaces de adherirse al epitelio y proliferar aún en presencia de neutrófilos, ya que no sólo se hace muy ineficiente su captura sino que además aquellas que son capturadas no son destruidas dentro del fagocito. Por último, al no producir activación de los

PMN es posible que la muerte extracelular por liberación del contenido de gránulos tampoco se produzca. Cabe agregar que a este mecanismo de inmunoevasión se suma el hecho de que una de las toxinas más importantes de *B. pertussis*, la toxina pertussis (PTx), retarda la llegada de neutrófilos al punto de infección.

La interacción de la bacteria con macrófagos es levemente diferente. De nuevo, en presencia de anticuerpos específicos que opsonicen la bacteria los macrófagos las capturan e inactivan eficientemente (Lamberti, *et al.* 2010). En ausencia de anticuerpos, a diferencia de lo que se observa en neutrófilos, un gran porcentaje de las bacterias fagocitadas

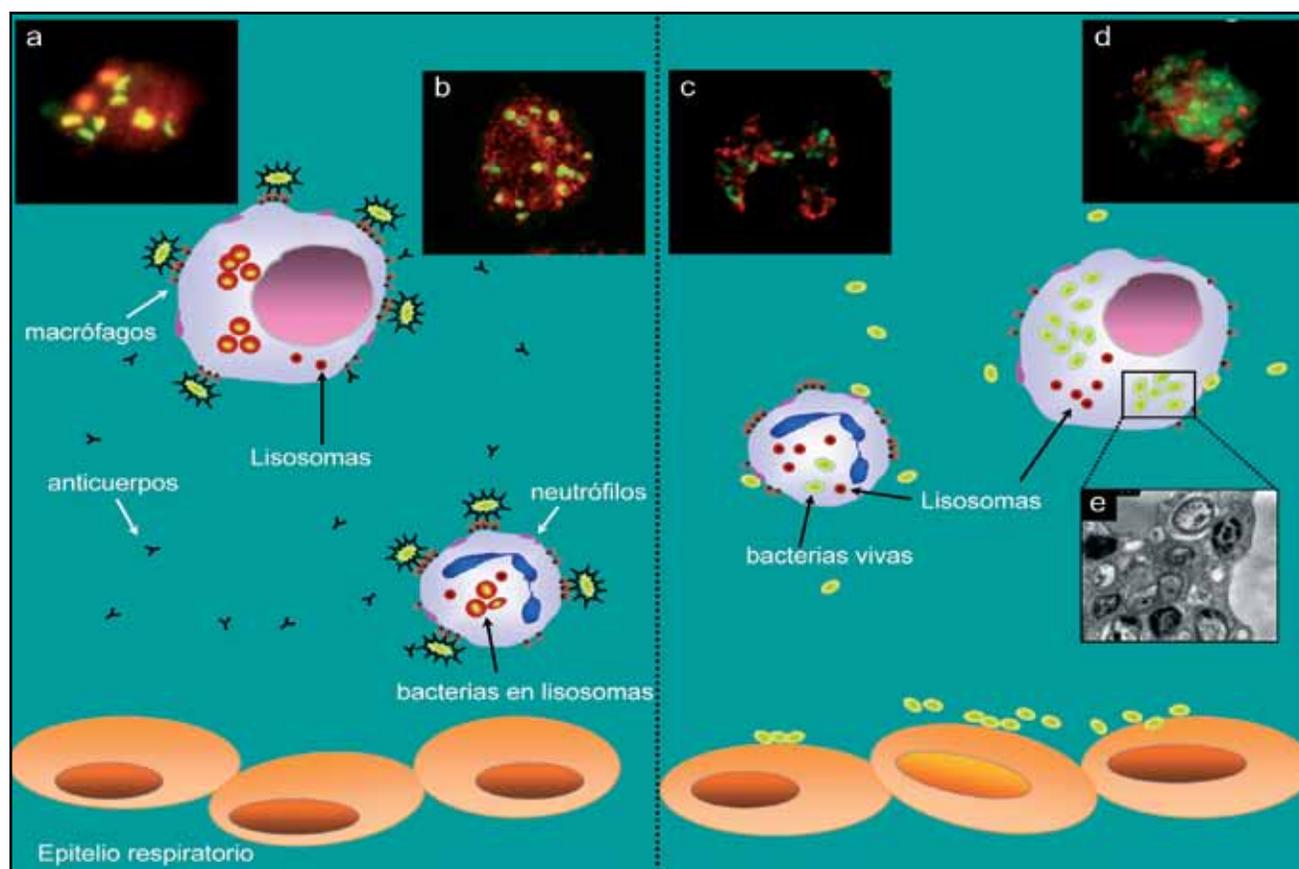


Figura 1. Interacción de *B. pertussis* con macrófagos y neutrófilos en presencia (panel izquierdo) y ausencia (panel derecho) de anticuerpos opsonizantes. Microscopía confocal de *B. pertussis* en macrófagos (b y d), y en neutrófilos (a y c) humanos, en presencia (a y b), o ausencia (c y d) de anticuerpos opsonizantes. *B. pertussis* esta marcada con fluorescencia verde y los compartimientos lisosomales con fluorescencia roja. Las áreas amarillas indican bacterias dentro de compartimientos lisosomales. e) Microscopía electrónica de macrófagos infectados con *B. pertussis*. Se observa la presencia de bacterias intracelulares rodeadas de vacuolas estrechas.

Ref. a y e) Tesis Doctoral. Yanina Lamberti. 2010. b) Lamberti *et al.* (2008) *Microb Path* 44: 501-511. c) Lamberti *et al.* (2010). *Infect Immun* 78: 907-913.

son destruidas durante las primeras horas post-fagocitosis en compartimientos lisosomales. Sin embargo, una fracción de las bacterias fagocitadas evade este tráfico y, por causas que aún deben establecerse, permanece en endosomas tempranos que no se acidifican ni ponen en marcha los mecanismos microbicidas. En estas vesículas la bacteria tiene acceso a nutrientes que la célula incorpora del exterior a través de la recirculación vesicular lo cual es característico de un fagosoma replicativo. En concordancia con estas observaciones, luego de 48 hs dentro del macrófago se observa un aumento significativo en el número de bacterias viables intracelulares, compatible con una replicación intracelular (Lamberti, *et al.* 2010). Estos resultados sugieren que *B. pertussis* se comporta como un patógeno intracelular facultativo lo cual explicaría la capacidad de persistencia en el hospedador. Esta localización intracelular le aseguraría un nicho de sobrevivencia y persistencia que requiere de una adaptación de la bacteria al entorno intracelular. Ensayos recientes indican que *B. pertussis* inhibe el aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en el macrófago infectado en respuesta al interferón (IFN)- γ , indicando que este patógeno modula negativamente la capacidad del macrófago de interactuar con otras células del sistema inmune tales como las células Th1, reduciendo así las posibilidades de ser destruido.

En general estos resultados nos permiten llegar a algunas conclusiones que conducen a un escenario posible del ciclo infeccioso de esta bacteria (Figura 1). En primer lugar la presencia de anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección es crítica para promover la eliminación temprana de esta bacteria mediante la intervención de las células inmu-

nes. Un aspecto relevante en lo que se refiere a los antígenos incluidos en la vacuna acelular en uso es que sólo uno de ellos, una proteína integral de membrana externa, la pertactina, es blanco de opsoninas (Hellwig *et al.* 2003). Lo que significa que la eliminación de la bacteria mediada por células depende de la presencia de este antígeno en el fenotipo infectante y de anticuerpos específicos contra el mismo. Este antígeno no sólo presenta variaciones en las regiones inmunodominantes en cepas circulantes respecto a la vacunal (Mooi *et al.* 1999), sino que se encuentra ausente (por deleciones) en aislados recientes (Bouchez *et al.* 2009) indicando una posible selección de cepas por vacunación, con un impacto importante en la protección conferida por vacunación. Nuevos antígenos de estas características, que se expresen en el fenotipo infectante deberían formar parte de las nuevas generaciones de vacunas. Por otro lado, tanto si la vacunación no induce anticuerpos que resulten opsonizantes como si el individuo tiene una inmunidad reducida o nula por vacunación incompleta o por períodos largos post vacunación, *B. pertussis* evadirá la actividad bactericida de neutrófilos y macrófagos evitando la inmuneliminación temprana y estableciendo así una infección que derivará en manifestaciones clínicas, o infecciones asintomáticas (como se da en la mayoría de los casos en adultos) transitorias o prolongadas, según el estado clínico del infectado. En este escenario nuestros resultados abonan la hipótesis de que *B. pertussis* podrá sobrevivir e incluso duplicarse dentro de macrófagos. Esto le puede significar ventajas sustanciales además de protegerla contra los distintos efectores inmunes. Durante la respuesta pro-inflamatoria inducida por la infección un nicho intracelular permitirá que la bacteria se mantenga viva hasta que la reac-

ción inflamatoria sea modulada por los distintos mecanismos anti-inflamatorios, permitiéndole emerger en condiciones de entorno más permisivas. Alternativamente los macrófagos podrían transportar las bacterias a nuevos sitios donde iniciar nuevas microcolonias.

■ ¿POR QUÉ HA EMPEORADO LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DESDE QUE SE INTRODUJO LA VACUNA ACELULAR?

La explicación más obvia para este fenómeno es que la vacuna celular tiene otros determinantes antigénicos de los que la vacuna acelular carece. Si bien algunos de ellos son responsables de los efectos tóxicos y son precisamente los que deben ser eliminados (como es el caso del lipopolisacárido), otros componentes contribuyen a la inmunidad protectora aunque se desconoce su identidad. Por otra parte, el tipo de inmunidad conferida por ambos tipos de vacunas es diferente. Las vacunas celulares promueven una mayor respuesta inflamatoria y se caracterizan por evocar respuestas de tipo Th1. Ensayos clínicos y evaluaciones en modelos animales demostraron la importancia de este tipo de respuesta en la protección contra esta bacteria (Mills *et al.* 1993). El hallazgo de que *B. pertussis* se comporta como un patógeno intracelular facultativo le da sustento a esta observación experimental ya que las respuestas Th1 son las que nos protegen de diversos patógenos intracelulares. La vacuna acelular tal como está formulada induce una protección menor que la vacuna celular pero aceptable para los Organismos de Salud, fundamentalmente porque la vacuna celular no puede emplearse en adultos y por el momento no hay formulaciones acelulares más efectivas. Mientras tanto, la búsqueda de nuevas vacunas continúa, para lo cual se están evaluando

do distintas estrategias, como la vía de inmunización, distintos arreglos antigénicos, nuevos adyuvantes, etc. (Sukumar *et al.* 2008; Skerry and Mahon 2011; Marr *et al.* 2008; Sukumar *et al.* 2009). A la discusión de la efectividad de las vacunas en uso se han agregado recientemente dos nuevos factores. Por un lado, y como se describiera más arriba, la posibilidad de que existan nichos intracelulares de persistencia que es necesario prevenir y/o combatir requiere de vacunas que evoquen respuestas Th1 y, por otro lado, la evidencia de que la bacteria infectante podría no expresar o tener una expresión reducida de los antígenos incluidos en las vacunas actuales. En relación a esto último, no sólo se han descrito variantes de los antígenos vacunales en cepas circulantes y cepas con deleciones en estos genes, sino que además se ha demostrado que durante la transmisión de hospedador a hospedador existen condiciones del entorno que modularían negativamente la expresión de estos antígenos (Veal-Carr & Stibitz, 2005; Merkel *et al.*, 9th International Bordetella Symposium, Baltimores, MD, USA, 2010), lo cual abre la posibilidad de que la bacteria infectante no sea reconocida por los anticuerpos inducidos en el individuo vacunado (aún en el caso de que existan), posibilitando la colonización inicial. La selección de nuevos inmunógenos no es una tarea fácil en el contexto del ciclo infeccioso de esta bacteria. Hay grupos trabajando en distintas hipótesis, entre los que se encuentra el nuestro. Nuestra estrategia está basada en la búsqueda de inmunógenos protectores entre las estructuras que son vitales durante la infección. La falta de hierro es una condición que todo patógeno de mamífero debe superar *in vivo* para ser capaz de colonizar. Estudios de expresión de genes durante la interacción de una gran variedad de patógenos con

su hospedador indican que los genes de adquisición de nutrientes, y en particular los implicados en la adquisición de hierro, representan la clase predominante de los genes expresados *in vivo* (Mahan *et al.* 2000). En respuesta a la falta de hierro los patógenos expresan sistemas de alta afinidad de captura de hierro que le permiten la obtención de este nutriente vital para la bacteria. Se ha demostrado que efectivamente *B. pertussis* está limitada en hierro durante la infección y expresa una batería de sistemas de captura que le permiten sobrevivir dentro del hospedador (Brickman *et al.* 2008). Anticuerpos contra estas estructuras podrían ser protectores por bloquear sistemas vitales, por interferir con la interacción con el epitelio, o por opsonizar la bacteria infectante induciendo así la eliminación mediada por células fagocíticas. Trabajando en esta hipótesis encontramos adhesinas que se expresan *in vivo*, que no están presentes en vacunas, y que inducen anticuerpos que interfieren con la adhesión, pudiendo representar antígenos protectores contra la colonización inicial (Perez Vidakovics *et al.*, 2007a). Ensayos de inmunodetección llevados a cabo con sueros de individuos infectados y vacunados confirmaron la presencia de estructuras inmunogénicas diferenciales en bacterias adaptadas a la falta de hierro reconocidas solamente por anticuerpos de individuos infectados, confirmando que estos antígenos se expresan durante la infección (Perez Vidakovics *et al.*, 2007a). Mediante proteómica comparativa e inmunoproteómica identificamos las proteínas inmunogénicas inducidas por la falta de hierro (Perez Vidakovics *et al.*, 2007b) y, entre ellas, aquellas proteínas antigénicas potencialmente involucradas en la supervivencia de la bacteria durante la infección, ausentes en toda formulación vacunal actual. Un aspecto importante es que los antígenos que

seleccionamos están conservados en las cepas circulantes en la población, que su expresión está inducida en altos niveles en condiciones infectantes y no depende del estado de virulencia de la bacteria, o sea no disminuyen su expresión durante la transmisión de hospedador a hospedador por condiciones del entorno. Siendo que este patógeno no sobrevive fuera de su hospedador (el hombre), la única fuente de transmisión es el hospedador humano y por lo tanto estará adaptada a la escasez de hierro y expresará todos los antígenos necesarios para esta adaptación cuando llegue al nuevo hospedador. De los antígenos seleccionados ya hemos evaluado dos de ellos como antígenos vacunales con resultados promisorios (Alvarez Hayes *et al.*, 2011) y se están estudiando otros dos que son potenciales antígenos inductores de inmunidad celular con el objeto de incorporarlos a nuevas vacunas a ser desarrolladas.

■ CONCLUSIONES

La reemergencia de la tos convulsa en todo el mundo, y su elevada incidencia como causa de mortalidad infantil trajo de nuevo al centro de la discusión la efectividad de las vacunas y las estrategias preventivas contra esta enfermedad infecciosa. La necesidad de reemplazar una vacuna celular por sus efectos tóxicos obligó a la formulación de vacunas acelulares que, aunque protectivas contra los síntomas de la enfermedad, han resultado deficientes en lo que se refiere a la prevención de la infección dando como resultado la situación epidemiológica actual. La vacuna acelular, formulada en base a los conocimientos existentes en ese momento vino a resolver una situación que se había vuelto acuciante. Hoy se cuenta con nuevos elementos sobre los que diseñar mejoras en la prevención. En este

sentido el descubrimiento de que es posible que existan nichos intracelulares de persistencia, la observación de que las cepas infectantes tienen una disminución temporal o permanente de los antígenos vacunales actuales, la caracterización del tipo de inmunidad que es necesario inducir en el vacunado, conjuntamente con otros aspectos claves del ciclo infeccioso que se han ido develando en estos últimos años, constituyen pilares sobre los que avanzar en mejoras significativas en formulaciones vacunales y estrategias preventivas en general.

■ BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Hayes J., Erben E., Lamberti Y., Ayala M., Maschi F., Carbone C., Gatti B., Parisi G., Rodriguez M.E. (2011) Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 29, 8731-8739.
- Andrews R., Herceg A., Roberts C. (1997) Pertussis notifications in Australia, 1991 to 1997. *Commun Dis Intell* 21, 145-148.
- Baron S., Njamkepo E., Grimprel E., et al. (1998) Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 17, 412-418.
- Borisova O., Kombarova S., Zakharova N., van Gent M., Aleshkin V., Mazurova I., Mooi F. (2007) Antigenic Divergence between *Bordetella pertussis* Clinical Isolates from Moscow, Russia, and Vaccine Strains. *Clin Vaccine Immunol* 14(3), 234-238.
- Bouchez V., Brun D., Cantinelli T., Dore G., Njamkepo E., Guiso N. (2009) First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* 27(43), 6034-6041.
- Brickman T.J., Hanawa T., Mark T.A., Sutherland R.J., Armstrong S.K. (2008) Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. *Mol Microbiol* 70(1), 3-14.
- Byrne S., Slack A.T. (2006) Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999-2003. *BMC Infect Dis*, 16 6:53.
- Cassiday P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K., Popovic T. (2000) Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* 182(5), 1402-1408.
- Crowcroft N.S., Britto J. (2002) Whooping cough—a continuing problem. *BMJ* 324, 1537-1538.
- de Melker H.E., Coyn-van Spaendonck M.A.E., Rümke H.C., et al. (1997) Pertussis in the Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole cell vaccine. *Emerg Infect Dis* 3, 175-178.
- De Serres G., Shadmani R., Duval B., et al. (2000) Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis* 182, 174-179.
- Edwards K.M., Meade B.D., Decker M.D., et al. (1995) Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 96(3 Pt 2), 548-557.
- Fingermann M., Fernández J., Sisti F., et al. (2006) Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* 24 (17), 3513-3521.
- Grimprel E., Baron S., Lévy-Bruhl D., Garnier J.M., Njamkepo E., Guiso N., Bégué P. (1999) Influence of vaccination coverage on pertussis transmission in France. *Lancet* 354(9191), 1699-1700.
- Guris D., Strebel P.M., Bardenheier B., et al. (1999) Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis* 28(6), 1230-1237.
- Gustafsson L., Hallander H.O., Olin P., Reizenstein E., Storsaeter J. (1996) A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* 334(6), 349-355.
- Gzyl A., Augustynowicz E., Rabczenko D. (2004) Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol* 33, 358-365.
- He Q., Mertsola J. (2008) Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 3(3), 329-339.
- Hellenbrand W., Beier D., Jensen E., et al. (2009) The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. *BMC Infect Dis* 9, 22.
- Hellwig S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A.M., van de Winkel J.G.J., Mooi F. (2003) Central Role of pertactin in immunity against *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 188, 738-742.
- Hewlett E.L., Edwards K.M. (2005) Pertussis—not just for kids. *N Engl J Med* 352, 1215-1222.
- Lamberti Y., Alvarez Hayes J., Perez Vidakovics M.L., Harvill E.T., Rodriguez M.E. (2010) Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 78: 907-913.
- Lamberti Y., Perez Vidakovics M.L., van der Pol L.-W., and Rodriguez M.E. (2008) Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival.

- val in neutrophils. *Microb Path* 44, 501-511.
- Mahan M.J., Heithoff D.M., Sinsheimer R.L., Low D.A. (2000) Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. *Annu Rev Genet* 34, 139-164.
- Marr N., Oliver D.C., Laurent V., Poolman J., Denoel P., Fernandez R.C. (2008) Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* 26(34), 4306-4311.
- Mattoo S., Cherry J.D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18(2), 326-382.
- Miller C.L., Fletcher W.B. (1976) Severity of notified whooping cough. *Br Med J* 1(6002), 117-119.
- Mills K.H., Barnard A., Watkins J., Redhead K. (1999) Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immun* 61(2), 399-410.
- Mooi F.R., He Q., van Oirschot H., Mertsola J. (1999) Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun*. 67(6), 3133-3134.
- Mooi F.R., van Oirschot H., Heuvelman K., van der Heide H.G., Gaastra W., Willems R.J. (1998) Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 66(2), 670-675.
- Nteyayabo B., De Serres G., Duval B. (2003) Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J* 22, 22-27.
- Pérez Vidakovics M.L., Lamberti Y., Serra D., Berbers G., van der Pol W.-L., Rodríguez M.E. (2007a) Iron stress increases *B. pertussis* mucin binding capacity and attachment to respiratory epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51, 414-421.
- Perez Vidakovics M.L., Paba J., Lamberti Y., André Ricart C., Valle de Sousa M., and Rodríguez M.E. (2007b) Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* 6(7), 2518-2528.
- Rodríguez M.E., Hellwig S.M., van der Pol W.-L., Hozbor D., Leusen J. van de Winkel J.G.J. (2001) Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 167, 6545-6551.
- Sato Y., Kimura M., Fukumi H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1, 122-126.
- Senanayake S. (2007) Pertussis in Australia today - a disease of adolescents and adults that can kill infants. *Aust Fam Physician*. 36 (1-2), 51-56.
- Skerry C.M., Mahon B.P. (2011) A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin Vaccine Immunol* 18(2), 187-193.
- Sukumar N., Love C.F., Conover M.S., Kock N.D., Dubey P., Deora R. (2009) Active and passive immunizations with *Bordetella* colonization factor A protect mice against respiratory challenge with *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 77(2), 885-895.
- Sukumar N., Sloan G.P., Conover M.S., et al. (2008) Cross-species protection mediated by a *Bordetella bronchiseptica* strain lacking antigenic homologs present in acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 78(5), 2008-2016.
- van Buynder P.G., Owen D., Vurdien J.E., Andrews N.J., Matthews R.C., Miller E. (1999) *Bordetella pertussis* surveillance in England and Wales: 1995-7. *Epidemiol Infect* 123, 403-411.
- Van Loo I., Mooi F.R. (2002) Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiology* 148, 2011-2018.
- Veal-Carr W.-L., Stibitz S. (2005) Demonstration of differential virulence gene promoter activation *in vivo* in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol* 55, 788-798.
- von König C.H., Halperin S., Riffelmann M., Guiso N. (2002) Pertussis of adults and infants *Lancet Infect Dis*. (12), 744-750. Review.
- Weber C., Boursaux-Eude C., Coralie G., Caro V., Guiso N. (2001) Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol* 39, 4396-4403.
- Wirsing von König C.H., Postels-Multani S., Bock H.L., Schmitt H.J. (1995) Pertussis in adults: frequency of transmission after household exposure. *Lancet* 346, 1326-1329.
- Yao S., Lin Y., Chou C., Chen Y., Hsiao M., Chen H., Yan J., Su H., Li S. (2005) Antigenic divergence of *Bordetella pertussis* isolates in Taiwan. *J Clin Microbiol* 43(11), 5457-5461.

Tuberculosis, una enfermedad cuya fisiopatología depende de una intrincada relación entre los mecanismos de resistencia del hospedador y el agente causal

Palabras claves: Tuberculosis, fisiopatogénesis, inmunidad innata y adaptativa
Key words: Tuberculosis, physiopathogenesis, innate and adaptive immunity

No obstante los esfuerzos realizados, la Tuberculosis (TB) sigue siendo un problema de salud mundial. De hecho, un tercio de la población está infectada con el agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), de los cuales, un 10% desarrollarán finalmente enfermedad activa. Varios factores contribuyen a ensombrecer el panorama, como la capacidad de la bacteria para evadir la respuesta inmune y la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana. El problema se agrava por la emergencia de mutantes resistentes a los fármacos con la aparición de tuberculosis multi y extremadamente resistente a las drogas antituberculosas. Por su naturaleza intracelular, *Mtb* está muy adaptado al hombre, su hospedador natural, particularmente al principal reservorio celular, el fagocito mononuclear, desarrollando estrategias para manipular la respuesta inmune del hospedador. Una respuesta exitosa contra un patógeno invasor requiere de una precisa coordinación de componentes del sistema defensivo. Durante el curso de la infección por *Mtb*, la respuesta inmune innata controla la diseminación de la micobacteria hasta el desarrollo de la respuesta adaptativa, la cual se halla demorada por las características del patógeno. Aunque la participación de la respuesta inmune celular es esencial, la respuesta protectora requiere la movilización de otras reacciones del hospedador. La naturaleza crónica de la infección tuberculosa y lo dilatado de la respuesta inmuno-inflamatoria acarrea varios cambios metabólicos y neuroendócrinos que afectan la homeostasis y por ende la capacidad defensiva. En este artículo se comentan trabajos recientes que resaltan la intrincada relación entre el patógeno y la respuesta del hospedador.

Despite much global efforts, tuberculosis (TB) remains a major world health problem. In fact, one third of the human population is infected with the etiologic agent *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), and among them, 10% will eventually develop active disease. Several factors contribute to the disease burden, for example the bacteria ability to subvert the host immune response and the simultaneous infection with the human immunodeficiency virus, among others. The problem is aggravated by the emergence of drug resistant *Mtb* mutants over drug-susceptible bacilli with the appearance of multidrug resistant and extensively drug resistant TB strains. As an intracellular pathogen, *Mtb* is highly adapted to its natural host, particularly its major host cell reservoir, the mononuclear phagocytes, adopting strategies which allow manipulating the host immune response. A successful host response against an invading pathogen requires the precise co-ordination of components of the defence system. During the course of *Mtb* infection, innate immune responses control the spread of the bacteria until the development of adaptive immune response, which is delayed by several particular characteristics of this intracellular pathogen. Although the participation of the cellular immune response is clear, protective immune responses involve the mobilization of other reactions of the host. The chronic nature of TB infection together with the protracted immuno-inflammatory response encompasses a series of metabolic and neuroendocrine changes that affect systemic homeostasis and hence host defense. Herein, recent studies that highlight the intricate interaction between the pathogen and the host response are commented.

■ UNA BREVE RESEÑA SOBRE LA TUBERCULOSIS, EL PATÓGENO Y LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA

La Tuberculosis (TB), cuyo agente causal es la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), es una enfermedad que ha azotado a la humanidad durante muchísimo tiempo. Posible-

mente el género *Mycobacterium* se originó 150 millones de años atrás. Los primeros antecesores de *Mtb* se hallaron en África oriental hace 3 millones de años, y probablen-

■ **María del Carmen Sasiain¹,
Oscar Bottasso^{2*},
Verónica García³**

¹ Instituto de Medicina Experimental, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires;

² Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario;

³ Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA

*bottasso@uolsinectis.com.ar

te habrían infectado a los primeros homínidos [Gutiérrez et al., 2005]. Esto constituiría el punto de partida de la interrelación entre el bacilo tuberculoso y el hombre como hospedador. Las cepas más recientes de *Mtb* parecen haberse originado de un ancestro común alrededor de 15.000 a 20.000 años atrás [Sreevatsan et al. 1997]. Aunque los primeros habitantes de África comienzan a migrar hace 1.7 millones de años, sería recién en los últimos 35.000-89.000 años donde se producen los grandes movimientos humanos [Gibbons, 2001], que seguramente favorecieron la dispersión de la patología.

Como patógeno intracelular *Mtb* puede residir en diferentes tipos celulares, pero tiene especial predilección por los macrófagos (MØ). La micobacteria es un bacilo ácido alcohol resistente de crecimiento lento y la vía de transmisión en humanos es primordialmente aerógena. Si bien las manifestaciones de la enfermedad usualmente ocurren en pulmón, la TB puede afectar cualquier órgano. Las micobacterias poseen una estructura de "pared" casi única entre los procariontes, que constituye su principal "arma de ataque" (factor de virulencia). Está formada por peptidoglicano más 60% de lípidos complejos (ácidos micólicos, factor cordón, sulfolípidos, manósidos, Lipoarabidomanano -LAM-, entre otros). Los lípidos le otorgan a la bacteria la impermeabilidad a co-

lorantes, resistencia a antibióticos, a la destrucción por compuestos ácidos y alcalinos, a la lisis osmótica, al efecto oxidativo y sobrevive dentro de los MØ (su hábitat "preferido"). Por su resistencia a los agentes físicos es necesario que para su eliminación en productos lácteos se emplee el proceso de pasteurización. También es resistente a agentes químicos, como a la mayoría de los desinfectantes. Así, queda clara la razón por la cual *Mtb* puede persistir en el hospedador a pesar que éste

genere una fuerte respuesta inmune en defensa a la infección.

El curso de la infección humana por *Mtb* es inusual para patógenos bacterianos. Luego de la infección, un pequeño porcentaje de individuos desarrolla TB primaria, mientras que la mayoría de los individuos puede controlar la infección, permanecer en un estado clínico de infección latente, y no desarrollar enfermedad. *Esta infección latente puede persistir a lo largo de toda la vida del*

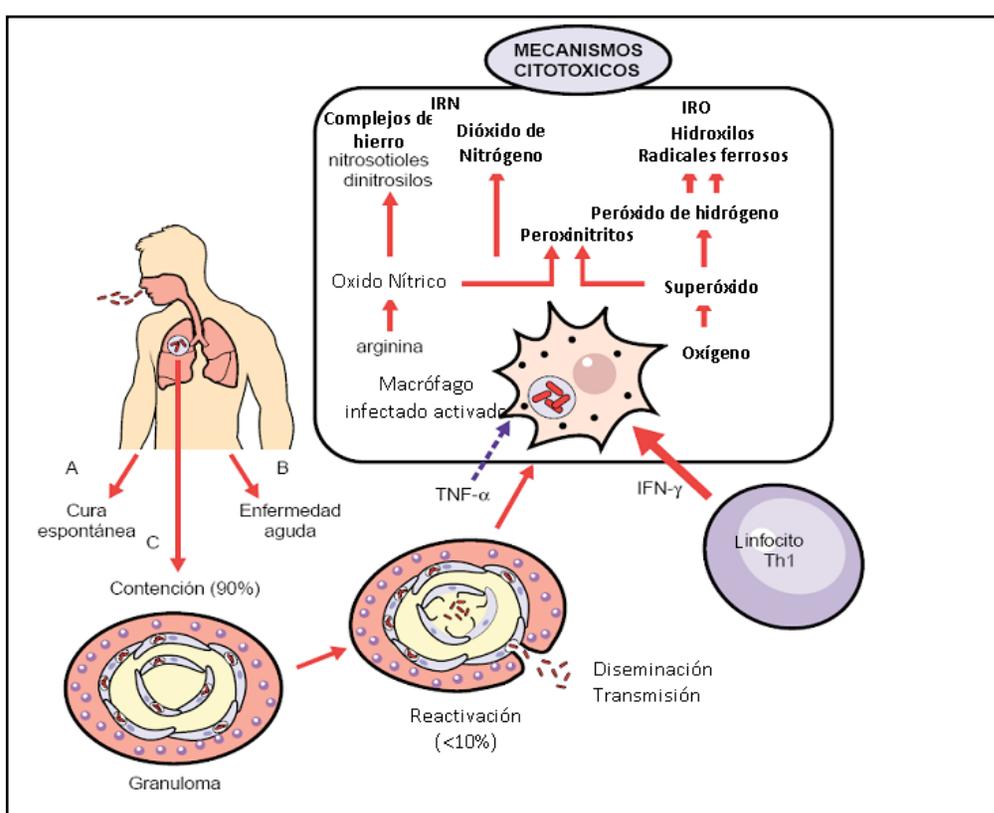


Figura 1. Características principales de la tuberculosis: desde la infección a la defensa del hospedador. Existen tres posibles desenlaces de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en el humano. A) La frecuencia de infecciones abortivas que resultan en curación espontánea se desconoce, pero se asume que es mínima. B) En el hospedador inmunocomprometido, la enfermedad puede desarrollarse luego de la infección. C) En la mayoría de los casos, la micobacteria es inicialmente contenida y la enfermedad se desarrolla posteriormente, como resultado de una reactivación. El granuloma es el sitio de infección, persistencia, patología y protección. Las células T efectoras (incluyendo linfocitos T CD4 y CD8 convencionales, y células T no convencionales como células T $\gamma\delta$, y doble negativas o las células T CD4- y CD8- que reconocen antígenos en el contexto de CD1) y los MØ participan en el control de la tuberculosis. El IFN- γ y el TNF- α , producidos por las células T, son importantes activadores de los MØ. La activación de los MØ permite la maduración de los fagosomas y la producción de moléculas microbicidas como los intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN) y los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO). Adaptado de Kaufmann SHE, *Nature Reviews Immunology* 1:20-30 (2001).

hospedador sin síntomas clínicos, pero en un 5-10% de las personas infectadas se produce una reactivación de esa infección produciéndose enfermedad. Esto puede ser ocasionado por diversos factores que lleven a inmunosupresión, tales como el tratamiento con corticosteroides, malnutrición o infección por HIV, por lo cual será la relación entre *Mtb* y la inmunidad del hospedador lo que determine si se desarrollará o no enfermedad.

La afectación pulmonar ocasiona desde algunas pocas lesiones infiltrativas hasta un cuadro de intensa inflamación con gran destrucción de parénquima. Este espectro de manifestaciones clínico-histopatológicas parece estar relacionado con la respuesta inmune del hospedador, dada su capacidad de mediar tanto protección como patología, como se ilustra en la Figura 1 [Flynn, 2004, García et al., 2011].

Si bien la respuesta inmune innata contra *Mtb* no ha sido aún completamente dilucidada, se sabe que la misma es sumamente importante, ya que algunos individuos con exposición primaria no resultan infectados (Figura 1). Durante la infección por *Mtb*, la respuesta inmune innata controla la dispersión de la bacteria, pero más tarde se requiere de los linfocitos T en el pulmón para contener al patógeno en los granulomas [Rachman et al, 2006]. El destino de un individuo expuesto a *Mtb* será determinado por varios factores, incluyendo factores genéticos y la fuerza y especificidad de los mecanismos de defensa endógenos montados contra el patógeno. Los MØ alveolares residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *Mtb*. Luego de este primer encuentro, las células dendríticas y los MØ derivados de monocitos también participan del proceso de fagocitosis a través del reconocimiento de

Mtb y/o sus productos, siendo éste un paso crucial para el desarrollo de respuesta inmune efectiva. Para ello, un gran número de receptores resultan críticos en el proceso de reconocimiento del bacilo. Así, a fin de controlar la diseminación de la bacteria, el sistema inmune del hospedador detecta estructuras moleculares conservadas, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), producidos exclusivamente por los microorganismos [Medzhitov et al., 2002]. Los PAMPs, son "sensores microbianos" o "alertas" para el hospedador y son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) sobre las células del hospedador. Si los patógenos modifican los PAMPs ponen en riesgo su supervivencia. El reconocimiento de los PAMPs por los RRP es un evento crucial para iniciar y coordinar la respuesta inmune innata, permitiendo al sistema inmune distinguir lo propio de lo ajeno/peligroso como prerrequisito para el estado de salud [García et al, 2011]. Algunos de estos RRP son los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*) 2 y 4 (TLR2 y TLR4) que se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune innato. En contraste, otros RRP, como el TLR7, se hallan dentro de las células; y finalmente, el último grupo de RRP, como surfactantes y proteína C reactiva, son solubles y se hallan en los fluidos corporales extracelulares. El reconocimiento de los PAMPs por los RRP facilita la toma del patógeno por las células del hospedador o la señalización requerida para inducir una respuesta inmune apropiada [Andrews, 2003]. La bacterias "virulentas" como *Mtb* expresan diferentes PAMPs, tales como lipoproteínas (19 kD) y glicoproteínas (lipoarabinomano manosilado -ManLAM- y manósido fosfatidilinositol -PIM-) [Akira S., 2009] presentes en la envoltura celular de la bacteria. Estos PAMPs micobacte-

rianos son detectados por diferentes RRP, como el receptor de manosa, receptores del sistema complemento, TLR2 y TLR4 [Doz E, 2007].

El reconocimiento de *Mtb* durante la respuesta inmune innata conduce a la activación celular y a la producción de quimiocinas y citoquinas inmunomoduladoras (Figura 2) que contribuirán a la inflamación y diferenciación celular. Así, estos mediadores reclutan células inflamatorias, entre ellas células T, asesinas naturales (NK) y neutrófilos, al área de infección, se produce la liberación del factor estimulante de las colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) e inducción del receptor de GM-CSF que dispara la diferenciación de monocitos a células dendríticas maduras, coordinando así el posterior desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Es decir, una vez que *Mtb* es fagocitado por los MØ alveolares, se desarrolla una respuesta inflamatoria local no específica. La mayoría de los mediadores en este punto (factor de necrosis tumoral α o TNF- α , interleuquinas IL-1 β , IL-12, IL-15, IL-18, entre otros) son producidos por MØ o células dendríticas, pero el interferón (IFN)- γ es secretado por células NK, células T $\gamma\delta$, y células T que reconocen antígenos presentados por las moléculas CD1. Más aún, se ha demostrado que este IFN- γ , podría también ser producido por monocitos, MØ y células presentadoras de antígeno (CPA). Tanto la producción de IFN- γ como la activación de los TLR inducen autofagia en los MØ, un proceso celular por el cual la célula degrada compartimentos intracelulares. Este proceso de autofagia induce un aumento de la actividad antimicrobiana en MØ humanos [García et al, 2011].

El hecho que la TB se presente con un diferente grado de compromiso orgánico habla de una comple-

ja interacción entre el agente infeccioso y la respuesta inmune celular (RIC) del hospedador, en la cual tendrá lugar una variada gama de eventos inmunopatológicos implicados en el daño tisular. En este marco contextual se comentarán hallazgos vinculados a aspectos sustanciales de la patología, desde una mirada que abarca componentes intrínsecos y extrínsecos que hacen al montaje de la respuesta defensiva.

■ EL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIO (SLPI) PARTICIPA EN LA INMUNIDAD INNATA CONTRA *MTB*

Dentro de la primera línea de defensa contra patógenos también

encontramos sustancias bactericidas o bacteriostáticas (lisozima, criptidinas, defensinas, entre otras), que junto con otros mecanismos iniciales de defensa evitan la colonización del patógeno como parte de la respuesta pleiotrópica del hospedador ante la probabilidad de infección. El SLPI es un inhibidor de serino proteasas secretado por células epiteliales e inflamatorias, principalmente en la mucosa respiratoria, fundamentalmente activo contra elastasa, catepsina G, tripsina y quimiotripsina [Hiemstra PS, 2002]. La expresión y secreción del SLPI disminuye en infecciones por adenovirus, por producción de TGF- β 1, y durante la enfermedad pulmonar obstructiva crónica [Luo BL et al, 2008; Higashi-

moto Y et al, 2005; Jaumann F et al, 2000]. Además, la exposición al humo del cigarrillo ocasiona el clivaje e inactivación del SLPI [Cavarrá E et al, 2001]. Asimismo, se demostró que el IFN- γ es un potente inhibidor del SLPI [Wang Z et al, 2000], y que éste puede funcionar como inmunomodulador endógeno, anti-inflamatorio, y/o sustancia antimicrobiana [Nishimura J et al, 2008; Sallenave JM, 2010; Williams SE et al, 2006]. Así, se han demostrado efectos antimicrobianos del SLPI contra hongos, virus y varias bacterias [Williams SE et al, 2006]. Particularmente, se ha descrito que el SLPI inhibía el crecimiento de *M.bovis* BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Mtb* por disrupción de la pared celular [Nishimura

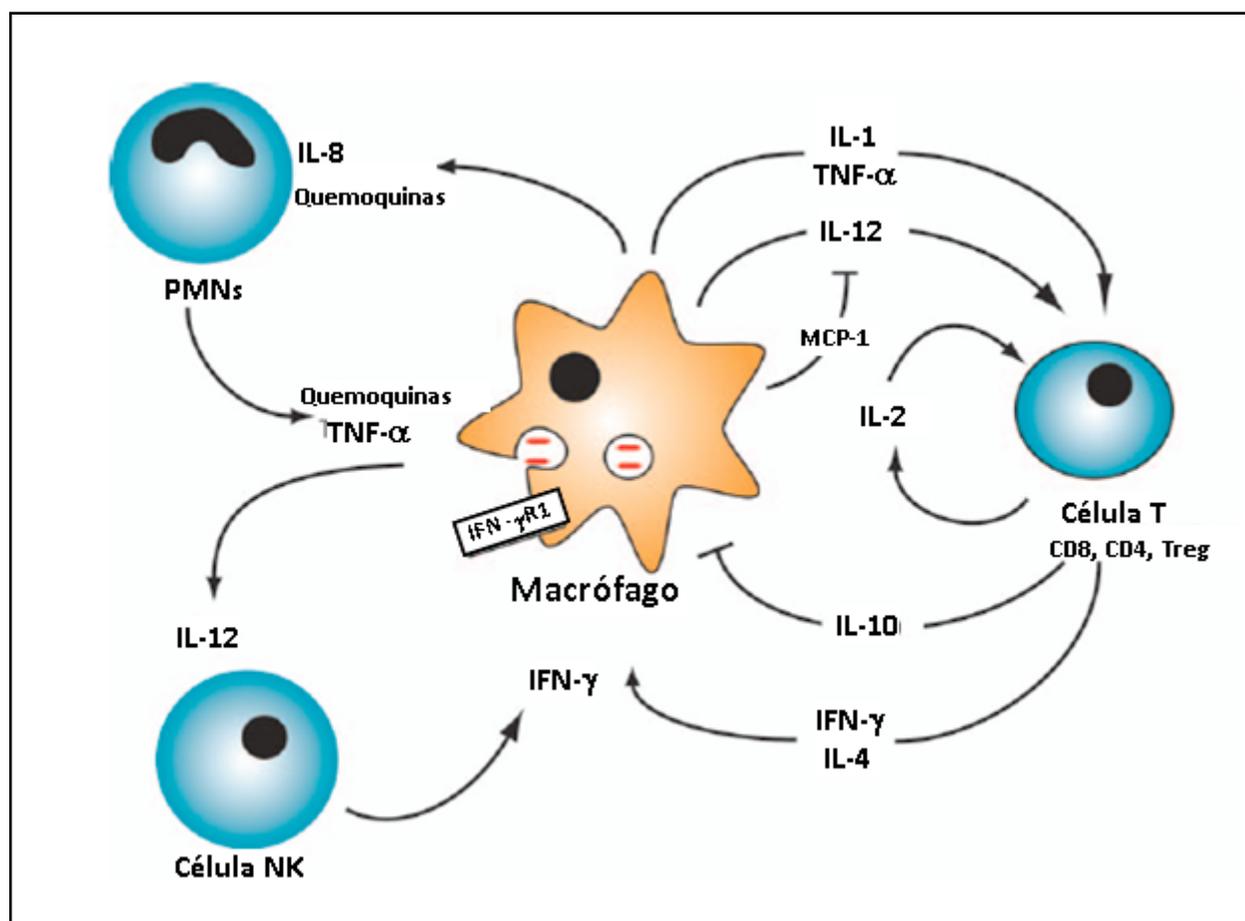


Figura 2. Respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis*. Luego de la infección, los MØ activados secretan citoquinas y quimiocinas que activan MØ, células T, neutrófilos y células NK. Las células T y las células NK producen IFN- γ que, junto con otras citoquinas, induce la activación de los MØ contribuyendo a la eliminación de *M. tuberculosis*. Adaptado de Berrington WR and Hawn TR, *Immunological Reviews* 219:167-186 (2007).

J et al, 2008]. A continuación se resumen una serie de estudios cuyos hallazgos más salientes permitieron demostrar la función del SLPI en la infección por *Mtb* [Gomez SA et al, 2009].

► *Determinación del efecto antimicobacteriano del SLPI.* Inicialmente, se investigó si el SLPI podría actuar sobre el patógeno y/o sobre las células del sistema inmune del hospedador. Así, se analizó el potencial efecto directo del SLPI sobre la viabilidad *in vitro* de *Mycobacterium*. Se demostró que el SLPI reduce la viabilidad de la cepa H37Rv de *Mtb* de manera dosis dependiente, es decir, a mayor concentración de SLPI mayor inhibición del crecimiento de *Mtb*, indicando que el SLPI actuaría sobre el patógeno.

► *Interacción directa entre el SLPI y la pared celular de micobacterias.* Los péptidos catiónicos como el SLPI, matan a las bacterias porque alteran la estabilidad de su pared celular. Por tal motivo, se estudió la capacidad del SLPI de unirse a *Mtb*. Los resultados indicaron que el SLPI se unió a la superficie de las partículas de *Mtb* presentes en esputo (saliva) de pacientes con TB activa. Para confirmar la presencia de micobacterias, las mismas se tiñeron me-

dante la técnica de Ziehl-Neelsen. Como muestra la Figura 3, el patrón de fluorescencia del SLPI fue similar a la tinción de Ziehl-Neelsen. Estos hallazgos demuestran que el SLPI se une directamente a la bacteria *Mtb*.

► *Unión del SLPI a lípidos micobacterianos.* Se investigó si el SLPI podía unirse a alguno de los PAMPs micobacterianos conocidos. Los resultados mostraron una fuerte unión entre el SLPI y ácido tripalmitico trehalosa dimicolato (TDM) y lipoarabinomanano manosilado (ManLAM), con una débil capacidad de unirse a fosfatidilinositolmanósido (PIM) y no se unió a la lipoproteína 19-kD o a los ácidos micólicos. En conjunto los hallazgos demuestran que SLPI se une específicamente a PAMPs conocidos de *Mtb* virulento, sugiriendo que actuaría como un RRP.

► *El SLPI facilita la fagocitosis de Mtb.* Para confirmar si el SLPI era un RRP, se analizó la capacidad de este inhibidor de serino proteasas para facilitar la fagocitosis de *Mtb* por MØ de ratón. Los experimentos indicaron que la fagocitosis de la cepa virulenta H37Rv por los MØ murinos aumentó cuando las bacterias estaban recubiertas con SLPI, demostrando que el SLPI no sólo es capaz de matar a las micobacterias

sino que también facilita la eliminación del patógeno por el sistema inmune.

■ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: UN MICROORGANISMO QUE EVOLUCIONÓ CON SU HOSPEDADOR

Mtb es uno de los patógenos humanos más exitosos y poco se conoce sobre su evolución. Probablemente a lo largo del último siglo la intervención humana, particularmente la vacunación masiva con BCG y el tratamiento con fármacos, haya ejercido una presión selectiva a la que sólo sobrevivieron los genotipos mejor adaptados. En este contexto, los genotipos de *Mtb* que actualmente prevalecen desarrollaron mecanismos que les permitieron evadir la respuesta inmune y adaptarse a su hospedador. Desde su aislamiento en 1905, la cepa de *Mtb* H37Rv ha sido extensivamente utilizada en investigación biomédica siendo su genoma descifrado completamente en 1998 [Cole et al., 1998]. Sin embargo poco se conoce sobre la relevancia del genoma de H37Rv con respecto al de los aislados clínicos de *Mtb*. El *Mtb* moderno evolucionó a través de eventos de delección, duplicación y recombinación así como polimorfismo de nucleótidos únicos (SNP) que dieron origen a la emer-

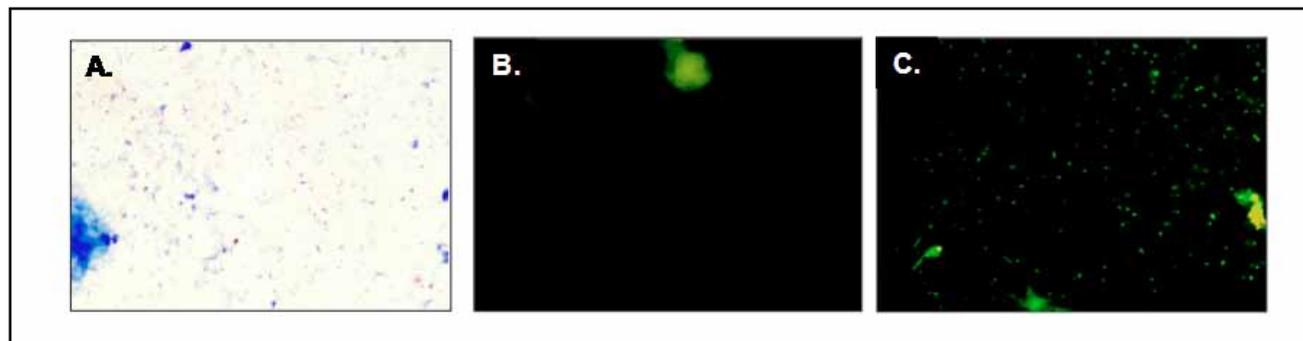


Figura 3. A) Presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (tinción para micobacterias) en muestras de esputo (saliva) de pacientes con tuberculosis. B y C) se muestran las mismas muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pero esta vez incubadas con un marcador fluorescente (anticuerpo monoclonal) inespecífico (B) o específico para detectar SLPI humano. En C se observan las bacterias fluorescentes al microscopio de fluorescencia.

gencia de líneas separadas de cepas con características patogénicas diferentes. El estudio de la diversidad de SNP y deleciones denominadas polimorfismos de secuencias largas (LSP) en colecciones de cepas globales permitió definir 6 linajes filogenéticamente distintos con fuertes asociaciones con su origen geográfico: Euro-americana, Asiática del este, Indo-Oceánica, Africana-Este, Africana-Oeste 1 y Africana-Oeste 2 [Gagneux et al., 2007].

Técnicas más recientes como el estudio de la secuencia de inserción IS6110 y el análisis del polimorfismo en ciertas regiones de unidades de repetición en el ADN (*spoligo-typing*), permitieron identificar, de los aislados clínicos, a cepas con amplia diseminación, cepas responsables de brotes o aquellas que causaron casos únicos de TB. La influencia de la variación genética de *Mtb* en la infección tuberculosa es un área reciente de investigación que, como en otras infecciones, demuestran que las mismas tendrían un papel esencial en el inicio de la TB. El entendimiento del impacto de la diversidad genética del *Mtb* sobre el desarrollo de la TB y la respuesta inmune del hospedador, comenzó a partir de trabajos describiendo cepas de brotes. La cepa CDC1551 (aislada de un foco de TB en Houston) se caracteriza por una alta tasa de transmisión en humanos con altos niveles de positividad al derivado proteico purificado de *Mtb* (PPD) o reacción de Mantoux, pocos casos de TB activa y capacidad de inducir en forma temprana altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias [Manca et al., 1999]. En contraste, distintas cepas de la familia W-Beijing que causaron brotes de TB multi-resistente en Europa y EEUU se caracterizan por ser hipervirulentas, produciendo en su hospedador alta carga bacilar y diseminación, daños histológicos severos con alto grado

de mortalidad, alta producción de TNF- α y déficit de IFN- γ , sugiriendo un posible mecanismo de desactivación del MØ (Parwati et al., 2010). Asimismo, una variante hipervirulenta de la familia Beijing, la cepa HN878, induce una fuerte respuesta inflamatoria que rápidamente es inhibida por células T regulatorias (Treg) productoras de IL-10. Paralelamente, se comunicó que las cepas causantes de brote crecen más rápidamente en el MØ que aquellas cepas de casos únicos, hecho éste que se asoció con su mayor transmisibilidad y recalca la importancia de la caracterización de cepas en aislados clínicos. Así, el éxito epidemiológico de un determinado genotipo dependerá del equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador y la evasión inmune de *Mtb*, que resulte en una tasa de transmisión favorable. Sin embargo, no existe consenso respecto a cuáles son los parámetros inmunológicos que reflejan la virulencia de *Mtb* en estos términos. En nuestro país el linaje prevalente es el Euro-Americano que comprende a diferentes familias: Haarlem, Latino-Americano-Mediterráneo (LAM), familia X (Europea IS6110 de bajas bandas) y familia T (Tuscany).

■ TUBERCULOSIS MULTI-RESISTENTE (TB-MDR) Y EXTENSIVAMENTE RESISTENTE (TB-XDR): DOS NUEVAS FORMAS DEVASTADORAS DE TB.

Según la OMS y la Liga Internacional contra la TB, Argentina es considerada un "punto caliente" para TB-MDR desde mediados de los '90, detectándose 110 casos nuevos por año (2003-2009, Fuente: ANLIS-Malbrán). Varios mecanismos podrían, solos o combinados, conducir al desarrollo de la TB-MDR en individuos HIV-negativos: 1) tratamiento incompleto/ inapropiado de TB sensible, 2) predisposición genética a la enfermedad, 3) deficien-

cia inmune por estados nutricionales o alcoholismo, 4) diferencia en la virulencia de distintas cepas de *Mtb* y 5) presencia de inmunodeficiencia cualitativa o cuantitativa de base. Así, la TB-MDR detectada en pacientes con historia de TB previa (TB-MDR adquirida) refleja generalmente acortamientos en el tratamiento anti-TB o bien un déficit en el tratamiento durante un largo período, ya sea por falta de suministro de una o más drogas o por falta de compromiso del paciente. Los casos observados en pacientes sin TB previa (TB-MDR inicial) se han originado en pacientes con un sistema inmune deficiente a partir de portadores que diseminan los bacilos resistentes en la comunidad. La situación epidemiológica de la TB se agravó a partir de los '80 por la irrupción de cepas MDR y cepas extensivamente resistentes (XDR) a drogas anti-TB. La TB-MDR es producida por cepas resistentes al menos a isoniazida (INH) y rifampicina (RIF), dos de las drogas más efectivas de primera línea [Mattelli et al., 2007]. El término TB-XDR apareció por primera vez en el 2006 y define a la TB causada por cepas con resistencias a INH y a RIF, a una fluoroquinolona y al menos a una de las tres drogas inyectables capreomicina, ampicacina y kanamicina. En Argentina se han comunicado ya 50 casos de TB-XDR (período 2002-2010; Servicio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán).

La TB-MDR emergió en Argentina a principios de los 90 entre pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) internados en hospitales de Buenos Aires y Rosario. Se aislaron e identificaron por estudios de la secuencia IS6110 a las cepas de los brotes Muñiz (BsAs) y Rb y Ra (Rosario) [Aita et al., 1996; Ritacco et al., 1997] las cuales luego se diseminaron a la comunidad afectando tanto a personal de salud como a contactos do-

miciliares o laborales [Palmero et al., 2003; Palmero et al., 2005]. La cepa Muñiz (M) pertenece al linaje Euro-Americano y, dentro de éste a la familia Haarlem, siendo una cepa MDR persistente y resistente a 6 drogas anti-TB. Entre los años 2003-2006 la cepa M fue la responsable del 34.7% de los casos de TB-MDR en pacientes HIV-, el 60% en pacientes HIV+ y el 42% de los casos de TB-XDR (Servicio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán), lo que resalta su virulencia y su peligrosidad. Llamativamente en la misma década se aisló una cepa genéticamente ligada a la M, la 410, que según el IS6110 difiere en una sola banda de inserción, habiendo causado solamente 1 caso de TB-MDR en más de 20 años. Si bien M y 410 pertenecen a la familia Haarlem (H2) y ambas son MDR, es evidente que la cepa M ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta del hospedador y lograr un alto grado de adaptación a nuestra comunidad.

Dada la importancia que el genotipo bacteriano tendría sobre la respuesta inmune de su hospedador, en los trabajos realizados en el laboratorio de Inmunología de la Tuberculosis del IMEX-CONICET, se comenzó a investigar dicha influencia con aislados clínicos locales de *Mtb* MDR. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

► En MØ derivados de monocitos humanos, la cepa M tiene menor capacidad de replicación intracelular *in vitro* que la cepa 410, en contraposición a lo observado con los aislados de la familia Beijing, en los que se encontró una correlación entre virulencia y replicación intracelular. Además, las cepas inactivadas difieren en su capacidad de modular la muerte celular del MØ, y en particular sólo la cepa M dis-

para un programa anti-apoptótico específico. Estos resultados indicarían que el éxito epidemiológico de la cepa M podría en parte deberse a su capacidad de preservar su nicho de replicación, el MØ e inducir una respuesta inmune que le permite pasar "desapercibida" al sistema inmune en las etapas iniciales de la infección [Yokobori N, Tesis de doctorado, 2010].

► La cepa M es pobre inductora de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ de individuos infectados pero que no desarrollan la enfermedad (latentemente infectados PPD+) respecto a la cepa de referencia H37Rv. Si bien en linfocitos T de individuos latentemente infectados la cepa M no induce expresión de IL-4, una citoquina característica del perfil Th2, sí lo hace en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con TB ya sea sensibles al tratamiento o con TB-MDR. Esto sugiere que la cepa M potencia la predisposición de los pacientes TB-MDR para desarrollar una respuesta tipo Th2 que no protege para la TB. Otra función que la cepa M altera es la capacidad de inducir la diferenciación de linfocitos T citotóxicos. Se observó que la respuesta T citotóxica antígeno-específica para lisar MØ autólogos inducida por la cepa M estaba sumamente disminuida tanto en pacientes con TB como controles normales. Se comprobó que la falta de inducción de respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos no era compartida por otras cepas de la familia Haarlem, puesto que la cepa MDR 410 (genéticamente emparentada a la cepa M), inducía una actividad lítica similar a H37Rv a pesar de ser pobre inductora de IFN- γ . Este hecho da firme sustento a que la falta de inducción de células T citotóxicas es una característica de la cepa M, y podría ser otro de los mecanismos empleados por ella para evadir la respuesta inmune y la lisis del MØ. Paralela-

mente, los estudios en pacientes TB-MDR infectados con la cepa M demostraron que *in vitro* sus células mononucleares de sangre periférica presentaban menor expresión de IFN- γ y actividad citotóxica en asociación con una alta expresión de IL-4. Estos resultados indicarían que la infección *in vivo* con la cepa M podría influenciar la respuesta adaptativa observada *in vitro*. Asimismo, los pacientes TB-MDR presentan una alta proporción de células Treg que se expanden por estimulación *in vitro* con *Mtb* independientemente de la cepa empleada. La depleción experimental de Treg aumentó la expresión de IFN- γ y la actividad citotóxica inducida por las cepas M y Ra en pacientes con TB, aunque la respuesta citotóxica inducida por la cepa M se mantiene menor que la obtenida con Ra. Por ello, la cepa M emplearía mecanismos adicionales para inhibir la respuesta T respecto a otros aislados clínicos [Geffner et al., 2009].

► La IL-17 es una citoquina proinflamatoria importante en procesos autoinmunes, rechazo de injertos y respuestas inmunes contra patógenos extra e intracelulares. Si bien se demostró que los linfocitos T CD4⁺ son la principal fuente de IL-17 (células Th17), tanto los linfocitos T CD8⁺, los linfocitos Tg δ , células NK y NKT producen IL-17 en microambientes que promueven la diferenciación de células Th17. Considerando esto, determinamos si las cepas MDR M y Ra, diferían en la inducción de la respuesta Th17. Se observó que ambas cepas son fuertes inductoras de la expansión de linfocitos T IL-17⁺, comparado con cepas sensibles del mismo linaje y con la cepa H37Rv. La expansión de células IL-17⁺ por las cepas MDR se observó tanto en pacientes con TB como en individuos latentemente infectados. Los pacientes TB-MDR presentaron una marcada expansión

de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y Tγδ⁺ expresando IL-17, debida esencialmente a una expansión diferencial de células IL-17⁺ IFN-γ. En TB-MDR la respuesta Th17 decreció con los días de tratamiento anti-TB, hecho posiblemente relacionado con la negativización del esputo (ausencia de bacilos en saliva). Efectivamente, la expansión de linfocitos T IL-17⁺ y de la población IL-17⁺IFN-γ se asoció directamente con la persistencia de una alta carga bacilar. Además, aquellos pacientes infectados con la cepa M presentaron mayores niveles basales de células IL-17⁺. Estos resultados sugieren que al tener menor actividad bactericida las drogas de segunda línea empleadas en el tratamiento, las cepas MRD inducen una fuerte respuesta Th17 que tendría un papel decisivo en el severo proceso inflamatorio observado en pacientes con TB-MDR [Basile et al., 2011]. En la Tabla 1, se grafican las diferencias entre las cepas MDR y H37Rv.

■ LA PLEURESÍA TUBERCULOSA: MODELO DE ESTUDIO *IN VIVO* DE LA RESPUESTA INMUNE A *MTB*

El derrame pleural tuberculoso es la localización más común de la infección tuberculosa primaria. Ocorre hasta en un 10 % de los pacientes de sexo masculino y algo menos en el sexo femenino. La pleuresía

tuberculosa es una reacción de hipersensibilidad retardada [Light RW, 2010] mediada por linfocitos T asociada a una fuerte resistencia específica que provoca la intensa reacción exudativa, e impide la evolución exudativo-caseosa de las lesiones. Los pocos bacilos que ingresan en la cavidad pleural son destruidos y de ahí la dificultad de hallarlos en el material extraído por punción. En cambio es casi constante la presencia de folículos gigantocelulares en las biopsias pleurales, lo que explicaría que sea una forma relativamente benigna de la enfermedad en términos de morbimortalidad y que a menudo resuelva sin tratamiento antibiótico. La pleura, es una membrana serosa constituida por una monocapa de células mesoteliales y tejido conectivo subyacente. Este espacio se encuentra bañado por una fina película de fluido cuyo volumen, composición y renovación se encuentran fisiológicamente controlados por el mesotelio pleural y drenaje linfático. En ciertas condiciones patológicas se produce un desbalance entre las fuerzas que controlan el volumen del líquido pleural ocasionando un derrame o efusión pleural. Las efusiones pleurales se clasifican básicamente como trasudados o exudados dependiendo del contenido en proteínas. Las poblaciones leucocitarias presentes en las efusio-

nes pleurales varían en función del origen etiológico y tiempo de evolución de la pleuritis. Así, infecciones bacterianas agudas desarrollan efusiones pleurales con un alto contenido en neutrófilos (empiemas), mientras que los derrames producto de infecciones intracelulares crónicas (como *Mtb*) son ricos en linfocitos TCD4⁺ [Barnes et al., 1989]. De un modo similar, los agentes etiológicos que inducen la efusión pleural condicionan el patrón de citoquinas presentes en ella determinando el perfil de la respuesta inmune a nivel local [Hiraki et al., 2003]. En las efusiones pleurales de pacientes con TB ha sido comunicada la presencia de concentraciones elevadas de diferentes mediadores solubles tales como quimiocinas [Quin et al., 2009], citoquinas [Song et al., 2002; Yamada et al., 2001; Zhang et al., 1994], enzimas fibrinolíticas [Hua et al., 1999], proteínas y péptidos microbicidas [Ashitani et al., 2002] y factores pro- y anti-apoptóticos [Hirsch et al., 2001]. Esto indica que las células presentes provienen de un microambiente específico y selectivo, de modo que su estudio resulta atractivo para el entendimiento de la inmunobiología de la TB. Así, se ha estudiado esta forma de TB y los hallazgos más salientes se resumen a continuación:

► *Ausencia de neutrófilos en las efusiones pleurales TB*: La ausencia de neutrófilos o granulocitos polimorfonucleares (PMN) en las efusiones pleurales tuberculosas se debe a una rápida inducción de apoptosis (muerte celular programada) que sería inducida directamente por antígenos de *Mtb* presentes en el líquido pleural [Alemán et al., 2005].

► *Papel de las células NK como productoras de IFN-γ*: Las células

Tabla 1:
Perfil de citoquinas inducido por M y Ra. Cuadro comparativo con la cepa de laboratorio H37Rv.

	M	Ra
IFN-γ	↓↓ N y TB	↓ N y TB
IL-4	↑↑ TB	↑ TB
IL-17	↑↑ TB y ↑ N	↑ TB
Respuesta CTL	↓ N y TB	~ H37Rv en N y TB

N: individuos sanos PPD+ (infección latente)

TB: pacientes con tuberculosis pulmonar activa

↓: respuesta menor que H37Rv

↑: respuesta mayor que H37Rv

CTL: actividad de linfocitos T citotóxicos

Tabla 2:
Análisis de sensibilidad y especificidad de la producción de IFN- γ (ROC).

	%de cambio IFN- γ Mediana (25-75% percentil)	Valor de corte (pendiente de corte óptimo)	Área bajo la curva ROC	Sensibilidad (95% CI)	Especificidad (95% CI)
Ensayo NK	30.69% (9.23–42.77%)	> 1.555% (11.57)	0.9643 (0.9002–1.028)	96.43% (81.65–99.91%)	91.67% (61.52–99.79%)
Ensayo T	2.14% (1.04– 4.63%)	> 1.230% (8.14)	0.9435 (0.8670–1.020)	67.86% (47.65–84.12%)	91.67% (61.52–99.79%)

NK, son células linfoides CD3⁻ que carecen de receptor T (TCR) o B (BCR) pero expresan los marcadores CD56 y CD16. En este tipo celular de respuesta inmune innata en efusiones pleurales de pacientes con TB, tanto la descripción fenotípica como funcional de células NK demostró que existe un enriquecimiento de la población CD56^{bright} productora de IFN- γ . Dicho enriquecimiento se debería a una susceptibilidad diferencial de la subpoblación CD56-CD16⁺ a la apoptosis que es mediada por factores/antígenos presentes en el líquido pleural [Schierloh et al., 2005]. La producción de IFN- γ depende de 3 señales: 1) la unión directa de *Mtb* a células NK, 2) la IL-12 producida por las CPA y 3) el diálogo recíproco entre células NK y CPA a través de receptores activadores e inhibitorios [Schierloh et al., 2007]. Además, las células NK cumplen funciones no convencionales dentro de la efusión pleural, como la capacidad de co-activar linfocitos T por interacción entre las moléculas ICAM-1 y LFA-1 [Schierloh et al., 2009]. La producción de IFN- γ frente al estímulo con *Mtb* es específica para efusiones pleurales tuberculosas, puesto que efusiones pleurales de origen neoplásico, parasitarias (helmintiasis) o de neumonías de la comunidad no inducen este mediador. Este hecho permitió proponer el

empleo de la producción de IFN- γ por células NK como un predictor útil de las efusiones pleurales de origen tuberculoso con alto grado de especificidad tras 48 h de estimulación. Por lo tanto, en las efusiones pleurales tuberculosas las células NK cumplen un rol decisivo en el direccionamiento de la respuesta Th1 [Schierloh et al., 2012]. En la Tabla 2 se muestra el análisis de sensibilidad y especificidad (curva ROC) para el ensayo de producción de IFN- γ por células NK y T.

La actividad de las células NK es regulada por un balance entre receptores activadores e inhibidores [MacFarlane AW et al, 2006], y esta regulación puede diferir entre distintas subpoblaciones de células NK. Se describió que las células NK expresan el receptor de muerte programada-1 (PD-1) [Urbani S et al, 2006], una molécula coestimuladora expresada en linfocitos T, monocitos, y M ϕ [Ishida et al, 1992; Agata et al, 1996; Nakae et al, 2006; Golden-Mason et al, 2008]. PD-1 reconoce dos ligandos (PD-Ls): PD-L1 y PD-L2, expresados sobre células T, B, células dendríticas, M ϕ y células NK, entre otras [Sharpe et al, 2007]. Existe amplia evidencia sobre la función de las interacciones de PD-1:PD-Ls en la inhibición de las respuestas inmunes. De hecho,

varios microorganismos que causan infección crónica, explotan esta vía de señalización para evadir los mecanismos inmunes efectores del hospedador [Zhong et al, 2007]. Al respecto, se demostró que la vía PD-1:PD-L inhibe las funciones efectoras de linfocitos T durante la TB humana [Jurado JO et al, 2008]. Sin embargo, no se conocía el rol de la vía de PD-1 en la inmunidad innata en procesos infecciosos. Particularmente, en células NK se investigó si las interacciones de PD-1:PD-Ls regulaban la respuesta en la TB humana. A continuación se resumen los hallazgos más salientes que permitieron demostrar la función del receptor PD-1 durante la TB [Alvarez et al, 2010]:

► *Las células NK de pacientes con TB activa expresan el receptor inhibitorio PD-1.* Luego de estimular *in vitro* con antígeno de *Mtb* células mononucleares de sangre periférica y de fluidos pleurales de pacientes con TB activa, se observó un incremento de moléculas de PD-1 sobre las células NK de pacientes con TB.

► *Existe una asociación directa entre los niveles de moléculas PD-1 e IFN- γ en células NK de pacientes con TB.* Se demostró la existencia

de una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de moléculas de PD-1 expresados por células NK de pacientes con enfermedad activa y el número de células NK productoras de IFN- γ en respuesta a *Mtb*. Estos resultados indican que el IFN- γ secretado por las células NK de los pacientes con TB contra *Mtb* estaría asociado al incremento de los niveles de PD-1 sobre dichas células.

► *El bloqueo de la interacción de las moléculas PD-1:PD-Ls aumenta notoriamente la producción de IFN- γ contra *Mtb* por células NK de pacientes con TB.* En conjunto, los hallazgos nos permiten describir una nueva función inhibitoria para la vía de señalización PD-1:PD-Ls en la inmunidad innata en TB (Figura 4) [Alvarez et al, 2010].

► *Los monocitos CD16+ y su rol en TB:* Los monocitos humanos se han clasificado en dos poblaciones en función de la expresión de CD14 y CD16, a saber: células CD14⁺CD16⁻ y células CD14⁺CD16⁺

[Ziegler-Heitbrock et al., 1993]. En individuos sanos, el primer *subset* (CD16⁻) constituye el 80-90% de los monocitos circulantes, mientras que el segundo *subset* (CD16⁺) constituye el 10-20% restante. En sangre periférica de pacientes con TB se observó que el *subset* CD16⁺ está incrementado respecto a controles normales, y que el mismo se correlaciona con la severidad de la enfermedad y con los niveles plasmáticos de TNF- α [Balboa et al., 2011].

En las efusiones pleurales tuberculosas, la caracterización de los monocitos demuestra que ambos *subsets* tienen un mayor grado de activación que en sangre periférica. Ambas poblaciones presentan mayores niveles de expresión de receptores para quimiocinas y de activación que sus contrapartes en sangre periférica, siendo los monocitos CD16⁺ los predominantes dentro de las efusiones pleurales. Estas características no fueron halladas en las efusiones pleurales de pacientes con cáncer, sugiriendo que la infección, y no la inflamación *per se*, induciría la acumulación de las células

CD16⁺ en la efusiones pleurales de origen tuberculoso. Además, el *subset* CD16⁺ en las efusiones pleurales presenta alta expresión de receptores para la entrada de *Mtb* a los monocitos, tales como moléculas de la familia de las lectinas de tipo C y de la integrina CD11b, de activación como TLRs, de moléculas coestimuladoras, así como de moléculas presentadoras de antígenos peptídicos y lipídicos respecto al mismo *subset* de sangre periférica. Dichos hallazgos justificarían la superior respuesta proliferativa frente a *Mtb* hallada en las efusiones pleurales y, por lo tanto, la buena respuesta inmune detectada en células de efusiones pleurales de origen tuberculoso [Balboa et al., 2011].

Estos datos revelan un rol dual de los monocitos que depende del contexto donde se los evalúe. A nivel sistémico su aumento está directamente relacionado con la severidad de la enfermedad, destrucción tisular, fibrosis, cavitación pulmonar y con los niveles plasmáticos de TNF- α . En la pleuresía tuberculosa, en cambio, su aumento se asocia con aumento

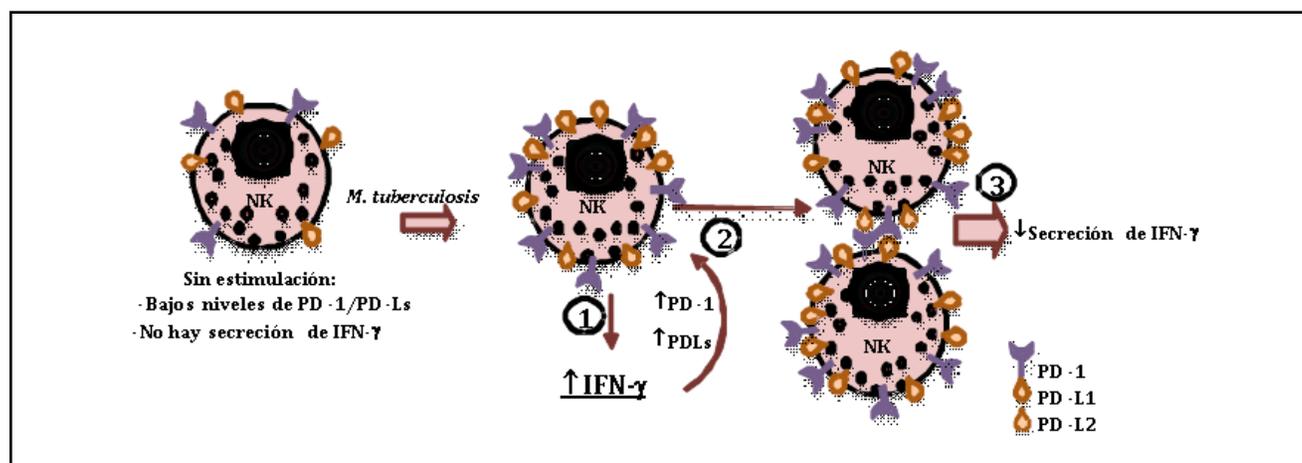


Figura 4. Rol de la vía de PD-1:PD-Ls sobre las funciones efectoras de células NK durante la tuberculosis humana. 1) Luego de la estimulación con el antígeno de *M. tuberculosis*, las células NK de pacientes con tuberculosis expresan mayores niveles de receptores de activación e inhibitorios, incluyendo PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2. En la presencia del patógeno, las células NK lisan las células infectadas con *M. tuberculosis* y producen grandes cantidades de IFN- γ . 2) Posteriormente, el IFN- γ secretado aumenta significativamente los niveles de expresión de PD-1 y de los PD-Ls. 3) Las interacciones de PD-1:PD-Ls entre células NK o entre células NK y otras células inhiben las funciones efectoras de las células NK, modulando la respuesta inmune innata contra la bacteria.

de receptores y moléculas asociadas a la presentación antigénica que conllevaría a una buena respuesta inmune contra *Mtb*.

■ ALGUNOS CONCEPTOS SOBRE LA REGULACIÓN NEURO-INMUNO-ENDOCRINA

El estrés es la respuesta de un organismo ante la percepción de fuerzas endógenas o exógenas, capaces de alterar un equilibrio dinámico. El mismo incluye una serie de cambios fisiológicos y conductuales que propenden a adaptarnos a la situación estresante a efectos de reducir el perjuicio que ello acarrea. Los cambios fisiológicos comprenden la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y el sistema nervioso autónomo. La estimulación del eje HPA lleva a la producción de dos hormonas muy importantes en la corteza de la glándula suprarrenal, el cortisol y la dehidroepiandrosterona (DHEA). Los agentes estresantes pueden alterar la respuesta inmunológica por medio de las citoquinas. Esto también representa un estrés, inmunológico, pero estrés al fin.

Las citoquinas inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1-b e IL-6) son claves para la interconexión del sistema inmune con el neuroendocrino. Dichos mediadores estimulan la producción de hormona liberadora de corticotrofina –CRH– en el hipotálamo con la posterior liberación de adrenocorticotrofina –ACTH– en la hipófisis que a su vez promueve la secreción de cortisol y DHEA a nivel de la corteza adrenal [Besedovsky & del Rey, 2006; Turnbull & Rivier, 1999]. Asimismo, la interrelación entre hipotálamo y pituitaria lleva a la secreción de otras hormonas como la hormona de crecimiento (somatotrofina), prolactina, tirotrófina y las gonadotrofinas, por lo que también pueden suscitarse cambios

a nivel de la reproducción y homeostasis energética.

La liberación de esteroides adrenales durante el curso de una respuesta inmune entraña a su vez una “modulación” sobre el desarrollo de la misma. Los glucocorticoides incluido el cortisol, interfieren con la expresión de genes para citoquinas proinflamatorias, a través de un impedimento en la señalización mediada por el NF- κ B [Auphan et al., 1995] a la vez que inhiben la actividad de células Th1 y facilitan las respuestas Th2 [Zhang et al., 1997]. En lo que hace a la respuesta inflamatoria, la DHEA frena la secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-6 y el consecuente daño tisular (Dillon, 2005). Respecto de la inmunidad adaptativa este andrógeno y su derivado sulfato (DHEAs) favorecen las respuestas Th1 [Dillon, 2005].

■ EL DESBALANCE INMUNO-ENDOCRINO DE LOS PACIENTES TUBERCULOSOS

Dado que la TB es una enfermedad infecciosa crónica y como tal es capaz de alterar la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el componente neuroendocrino, el análisis de las alteraciones que pueden suscitarse a este nivel es de valía. Por un lado se sitúan las manifestaciones vinculadas a trastornos metabólicos, lo cual puede repercutir sobre el montaje de la respuesta inmune, habida cuenta que el aporte energético es sustancial para el mantenimiento de la respuesta inmune [Hotamisligil and Erbay, 2008]. Por otro lado en las variaciones de la respuesta inmune según la severidad de la enfermedad [Bottasso et al., 2009], pueden intervenir procesos que van más de allá de lo estrictamente inmunológico.

Dentro de este esquema conceptual, hace unos años se analizaron los niveles circulantes de IFN- γ , IL-10, e IL-6 conjuntamente con hormonas pituitarias, tiroideas (T3, T4) y esteroides en pacientes TB de reciente diagnóstico con diferente grado de afectación pulmonar. Los mismos presentaban niveles plasmáticos aumentados de IFN- γ , IL-10, e IL-6, en presencia de valores descendidos de testosterona y DHEA. En paralelo, las concentraciones de somatotropina (GH) estaban francamente incrementadas sin cambios en el factor de crecimiento similar insulina-1 (IGF-1), con leves aumentos de cortisol, estradiol, prolactina (PRL), y hormonas tiroideas [del Rey et al., 2007]. Dado que dicho patrón de alteraciones se aparta de lo observable en estrés crónico, donde cortisol, PRL, T3-T4 y GH se hallan reducidos, el hecho podría atribuirse a un sesgo ocasionado por la presencia de mediadores inmunológicos liberados a raíz de la respuesta anti-TB, habida cuenta de los efectos de las citocinas sobre las funciones endocrinas [Besedovsky & del Rey, 1996; Turnbull & Rivier, 1999].

En función de los efectos de los esteroides adrenales sobre la respuesta inmune [Besedovsky & del Rey, 1996; Turnbull & Rivier, 1999; Dillon, 2005], el aumento de cortisol y el descenso de DHEA podrían estar impidiendo el desarrollo de una respuesta inmune celular adecuada hacia la micobacteria. Esta hipótesis se vio sustentada al comprobarse que los niveles plasmáticos de DHEA se correlacionaban positivamente con los niveles de IFN- γ presentes en los sobrenadantes de cultivo de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes TB estimuladas con *Mtb*, mientras que la relación cortisol/DHEA se asoció negativamente con la producción *in vitro* de esta citoquina [Bottasso et al., 2009]. El desbalance entre

ambos esteroides tampoco parece adecuado para el control de la inflamación, ya que el modesto incremento de cortisol no sería suficiente para compensar el reducido accionar anti-inflamatorio de la DHEA en virtud de su notable caída. Esta situación podría incluso acentuarse en los pacientes con formas progresivas a juzgar por un estudio reciente respecto a la expresión del receptor para glucocorticoides en células mononucleares de sangre periférica de enfermos TB. La mayor parte de las acciones inmunomoduladoras de los GC se llevan a cabo a través de su interacción con la isoforma activa del receptor, GR α , ya que isoforma GR β es incapaz de hacerlo y actuaría como dominante negativo de la acción de los glucocorticoides [Barnes & Adcock, 2009]. En los pacientes con TB severa la relación entre los transcritos GR α /GR β es inferior a la observada en los casos leves y moderados lo cual apunta a un cierto grado de resistencia a la acción de los GC endógenos en los primeros [D'Attilio 2011].

A nivel de las hormonas hipofisarias, el aumento en los niveles de prolactina y el notorio incremento de somatotrofina podría aparecer como beneficioso en virtud de sus efectos estimulantes sobre la respuesta inmune celular [Dorshkind & Horseman, 2000]. Sin embargo, esto no parece estar ocurriendo puesto que las concentraciones de IGF-1, que media los efectos de GH, no se vieron aumentadas [Dorshkind & Horseman, 2000], lo que sugiere un cierto grado de resistencia a GH en los pacientes.

Tomados en su conjunto, el perfil hormonal de los pacientes emerge como inapropiado tanto para el montaje de una inmunidad protectora como para contrarrestar el proceso inflamatorio.

■ EFECTOS RECÍPROCOS ENTRE LOS ESTEROIDES ADRENALES Y LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA DE LOS PACIENTES TB

En razón de los efectos inmunomoduladores del cortisol y la DHEA, también se estudió la influencia que ambos esteroides podían ejercer sobre la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes ante la estimulación *in vitro* con antígenos de *Mtb*. El tratamiento con cortisol, en concentraciones levemente supra fisiológicas, redujo la linfoproliferación y producción de IFN- γ sin que ello fuera modificado por la DHEA, aunque sí pudo comprobarse que este esteroide ocasionaba un descenso significativo en la producción del factor transformante del crecimiento (TGF)- β que los pacientes severos sintetizaban en grandes cantidades [Mahuad et al., 2004], una citoquina bien conocida por sus efectos inmunosupresores en TB [Bottasso et al., 2009]. Con ello se aportaba un dato más a favor del papel de los esteroides adrenales como partícipes de las alteraciones inmunológicas observadas en los pacientes, considerando que estos enfermos presentan un aumento y descenso de cortisol y DHEA, respectivamente.

También se analizó si los mediadores liberados durante la respuesta inmune anti-tuberculosa podían modular la producción de esteroides adrenales. Pudo observarse que los sobrenadantes de cultivo (SN) de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes TB estimuladas con *Mtb* inhibían la secreción de DHEA por una línea de células adrenales humanas NCI-H295-R [del Rey 2007]. Posteriormente, se comprobó que el tratamiento con anticuerpos anti-TGF- β abrogaba los efectos inhibitorios de los SN sobre la producción de DHEA por dichas células [manuscrito en prensa]. Así

las cosas, la relación DHEA-TGF- β emerge como un ejemplo palmario del diálogo cruzado entre los sistemas inmune y neuroendocrino.

■ LAS ALTERACIONES INMUNO-ENDOCRINAS GUARDAN RELACIÓN CON EL ESTADO CLÍNICO DE LOS PACIENTES Y LAS ANORMALIDADES INMUNOLÓGICAS

El estado de consunción de los pacientes TB es un proceso complejo que no puede ser totalmente explicado por la pérdida de apetito que presentan. Más bien sería el resultado de un desbalance entre catabolismo y anabolismo. El mantenimiento de un estado inflamatorio crónico entraña la producción de diversos factores humorales, fundamentalmente citoquinas, y también algunas hormonas, las cuales en virtud de sus efectos pleiotrópicos pueden llevar a una serie de alteraciones que derivan en la pérdida de peso, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ [Langhans, 2000].

Dentro de este contexto, se constató una asociación negativa entre el índice de masa corporal (IMC) y los niveles circulantes de IL-6 [Bottasso et al., 2009]. Al respecto es sabido que además de estimular el gasto energético y reducir la grasa retroperitoneal [Wallenius et al., 2002], la presencia de IL-6 en el líquido cefalorraquídeo se correlaciona negativamente con el peso corporal de los pacientes obesos [Stenlof et al., 2003].

Recientemente también se analizaron mediadores que participan de la unidad inmuno-endocrina-metabólica y por ende tienen que ver con el peso de los enfermos, tales como leptina, adiponectina, IL-6, IL-1 β , ghrelina, proteína C reactiva (PCR), cortisol y DHEA [Santucci et al., 2011]. Los pacientes tenían un menor IMC con niveles reducidos

de leptina y DHEA, mientras que las concentraciones de PCR, IL-6, cortisol, IL-1 β y adiponectina se hallaban aumentadas. Dentro de los pacientes el IMC y la leptina descendían aún más en la enfermedad progresiva, mientras que se elevaban las concentraciones de IL-6, PCR, IL-1 β , cortisol, y ghrelina.

La leptina está involucrada en el control de la energía al reducir la ingesta y aumentar el gasto energético [Kelesidis et al., 2010]. La conocida asociación de esta adipocitoquina con el IMC -también visualizada en TB- y con la masa de tejido adiposo [Considine et al., 1996], sugieren que el descenso constatado en los pacientes tiene que estar vinculado a la pérdida de peso que experimentan los mismos. Como posibilidad adicional y no excluyente, la estimulación crónica con citocinas pro-inflamatorias suprime la producción de leptina [La Cava & Matarese, 2004] y ello también puede aplicarse a la TB. Dentro de los componentes que participan en la regulación de la ingesta, la adiponectina está relacionada con un aumento del apetito, distribución de la grasa central y múltiples trastornos metabólicos [Lara-Castro et al., 2006], mientras que la ghrelina es un potente estimulante del apetito que controla el gasto energético [Lorenzi et al., 2009]. Esta actividad complementaria de leptina, ghrelina y adiponectina en proveer información al SNC acerca del balance energético y mantenimiento de la homeostasis, aparece trastocada en TB dado que el patrón circulante es compatible con un efecto final orexigénico (aumento del apetito) que de hecho no se da.

Si bien los glucocorticoides pueden tener algunos efectos anti-lipolíticos en situaciones relacionadas con la obesidad [Peckett et al., 2011], el aumento de cortisol de los

pacientes TB puede favorecer la pérdida de masa corporal, dado que la hormona moviliza los depósitos de grasa al inducir lipólisis, inhibir la síntesis proteica y estimular la proteólisis en células musculares [Dallman et al., 1993]. Sumado a ello, el cortisol también puede inhibir la ingesta alimenticia [Kellendonk et al., 2002].

En razón de la necesidad de comprender la respuesta defensiva de un modo integral, se empleó una estrategia para analizar las variables en forma simultánea como lo es el análisis discriminante. El método es apropiado a fin de hallar una combinación aditiva de variables que posibilitan la mejor separación de los individuos y así clasificarlos en el grupo correcto. También permite la identificación de las variables que contribuyen más significativamente a tal discriminación. La técnica puso en evidencia que el perfil de variables elegidas hacía posible distinguir claramente a los pacientes de los demás grupos (convivientes y controles). Así quedó en evidencia que el descenso de DHEA, IMC y aumento de PCR eran los que tenían un mayor poder de discriminación dentro del grupo de pacientes [Santucci et al., 2011]. Esto vuelve

a poner sobre el tapete la relevancia del componente inflamatorio, y el balance energético negativo en TB. El hecho de que el tratamiento con un derivado sintético de DHEA mejora el curso de la TB experimental en ratones [Hernández-Pando et al., 2005] deja incluso abierta una puerta para explorar su eventual utilización como terapia adyuvante para los pacientes.

■ EL COMPONENTE INMUNO-ENDÓCRINO EN LA FISIOPATOGÉNESIS DE LA TB. A MODO DE SÍNTESIS

Los sistemas inmune y neuroendocrino desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad ante amenazas internas y externas. Dicha interacción persigue optimizar la efectividad del organismo, con el propósito de desarrollar una defensa exitosa y adaptación del hospedador a un hecho alarmante.

Los estudios en TB apuntan a que el escenario puede tornarse distinto en procesos de naturaleza crónica, a juzgar por el desbalance plasmático de los mediadores inmuno-endocrinos y su vinculación con el estado de consunción; la inhibición en la secreción de DHEA cuando las células

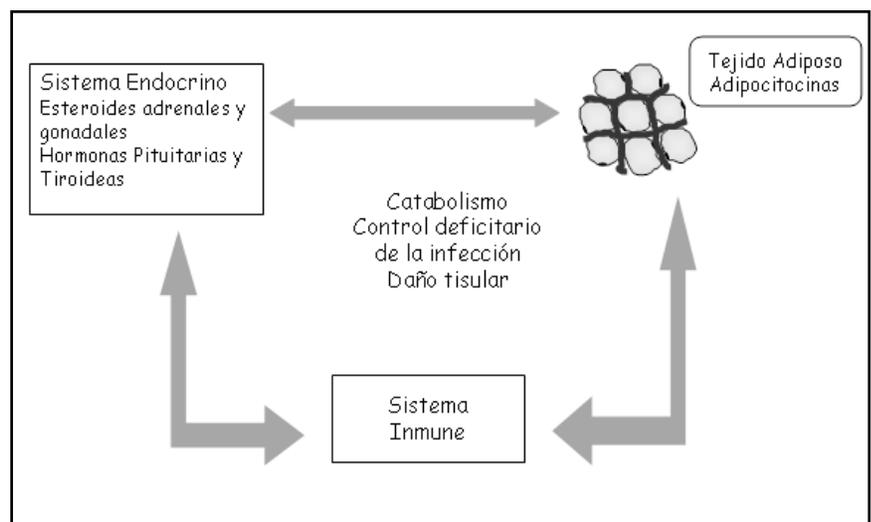


Figura 5. Principales interrelaciones inmuno-endócrinas vinculadas a la fisiopatogénesis de la Tuberculosis.

las son expuestas a los SN como así también los efectos *in vitro* de los esteroides adrenales sobre la respuesta inmune celular (ver Figura 5).

Desde una visión más "supra" sin lugar a dudas el hipotálamo es un área clave del cerebro para el control de funciones esenciales del organismo tales como las somáticas, autonómicas y neuroendocrinas y finalmente inmunológicas. En su conjunto estos procesos integran, a su vez, un programa de defensa bajo el control de otra región del cerebro denominada el lóbulo límbico. Se establece así a una serie concatenada de procesos emocionales-neuroendocrinos-inmunitarios que pueden brindarnos una aproximación al porqué del incremento en el riesgo de enfermar durante estados emocionalmente adversos y estresantes.

Cuando en 1882 Robert Koch identificó el bacilo de la TB, sólo estábamos conociendo "la causa necesaria". A principios del XIX y a contrapelo de la teoría infecciosa de la TB varios autores del Norte Europeo sostenían la idea de una enfermedad heredable o bien causada por preocupaciones mentales de causas variadas en especial aquellas debidas a un intelecto precoz o una especie de hipersensibilidad creativa y poética. Esta "estética tuberculosa" había sido abonada por historias de mujeres que ante pérdidas afectivas enfermaban y morían, suerte de heroínas sentimentales o novias celestiales. El advenimiento de abordajes interdisciplinarios, da cuenta que los románticos tenían su parte de razón.

■ AGRADECIMIENTOS

Los trabajos comentados por la Dra. Sasiain se realizaron en el IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, con la participación de los siguientes investigado-

res y becarios: Silvia de la Barrera, Mercedes Alemán, Pablo Schierloh, Noemí Yokobori, Luciana Balboa, Laura Geffner, Evangelina Laborde, Juan Basile, Mercedes Romero y Carmen Sabio y García. También participaron el ANLIS-Malbrán en las personas de Viviana Ritacco, Beatriz Lopez y Lucia Barrera como así también el Instituto Vaccarezza-UBA y Hospital Francisco Muñiz: Rosa Musella, Jorge Castagnino, Marisa Vescovo, Ana García, Mónica Cufre, Pablo González Montaner, Graciela C. de Casado y Domingo Palmero.

Los aportes efectuados por el Dr. Oscar Bottasso fueron realizados en el Instituto de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario en el que participaron las Dras. María L. Bay, Carolina Mahuad, Griselda Dídoli, Verónica Bozza, Luciano D'Attilio, Bettina Bongiovanni, Natalia Santucci y la becaria Ariana Díaz. También colaboraron los médicos de los Servicios de Neumología de los Hospitales Carrasco, Provincial del Centenario y Granadero Baigorria.

Los trabajos comentados por la Dra. Verónica García se realizaron en el Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y en el Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, con la participación de los siguientes investigadores: Dres. H. Eduardo Chuluyan, Ivana B. Alvarez, Virginia Pasquinelli, Javier O. Jurado, Sonia A. Gómez, Diego Guerrieri, Nancy L. Tateosian y Nicolas O. Amiano. También participaron el ANLIS-Malbrán en las personas de Claudia L. Argüelles y Rut Slimovich, como así también la Dra. Rosa Musella del Hospital Francisco Muñiz.

■ REFERENCIAS

- Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Sato M, Imamura S, Minato N, Yagita H, Nakano T, Honjo T. (1996) Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology* 8, 765-72.
- Aita J, Barrera L, Reniero A, Lopez B, Biglione J, Weisburd G, Rajmil JC, Largacha C, Ritacco V. (1996) Hospital transmission of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rosario, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 56, 48-50.
- Akira S. (2009) Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences* 85, 143-156.
- Aleman M, de la Barrera S, Schierloh PL, Alves L, Yokobori N., Baldini M, Abbate E, Sasiain MC. (2005) In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *The Journal of Infectious Diseases* 192, 399-409.
- Alvarez IB, Pasquinelli V, Jurado JO, Abbate E, Musella RM, de la Barrera SS, García VE. (2010) Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases* 202, 524-532.
- Andrews T, Sullivan KE. (2003) Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. *Clin Microbiological Reviews* 16, 597-621.
- Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S. (2002) Elevated levels

- of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Chest* 121,519-526.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NFkB activity through induction of Ikb synthesis. *Science* 270, 286-290.
- Balboa L, Romero MM, Basile JJ, Sabio y Garcia CA, Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, Musella RN, Castagnino J, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Aleman M. (2011) Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *The Journal of Leukocyte Biology* 90, 69-75.
- Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH, Modlin RL. (1989) Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *The Journal of Immunology* 142, 1114-1119.
- Barnes PJ, Adcock IM. (2009) Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 373, 1905-1917.
- Basile JJ, Geffner LJ, Romero MM, Balboa L, Sabio YGC, Ritacco V, Garcia A, Cuffre M, Abbate E, Lopez B, Barrera L, Ambroggi M, Aleman M, Sasiain MC, de la Barrera S. (2011) Outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis* MDR strains induce high IL-17 T-cell response in patients with MDR tuberculosis that is closely associated with high antigen load. *The Journal of Infectious Diseases* 204, 1054-1064.
- Besedovsky H, del Rey A. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and Hypothesis. *Endocrine Reviews* 17, 64-95.
- Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. (2009) Immuno-endocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. *Neuroimmunomodulation* 16, 68-77.
- Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G. (2001) Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 81, 412-417.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 334, 292-295.
- Dallman M, Strack A, Akana S, Bradbury MJ, Hanson ES, Scribner KA, Smith M. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. (1993) *Frontiers in Neuroendocrinology* 14, 303-347.
- D'Attlio L, Trini E, Bongiovanni B, Dídoli G, Gardeñez W, Nannini LJ, Giri A, Bottasso OA, Bay ML. (2011) mRNA expression of alpha and beta isoforms of glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear cells of patients with tuberculosis and its relation with components of the immunoendocrine response. *Brain Behavior and Immunity* 25, 461-467.
- del Rey A, Mahuad CV, Bozza V, Bogue C, Farroni MA, Bay ML, Bottasso OA, Besedovsky HO. (2007) Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behavior and Immunity* 21, 171-179.
- Dillon J. (2005) Dehydroepiandrosterone, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Related Steroids: Their Role in Inflammatory, Allergic and Immunological Disorders. *Current Drug Targets - Inflammation Allergy* 4, 377-385.
- Dorshkind K, Horseman ND. (2000) The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Reviews* 21, 292-312.
- Doz E, Rose S, Nigou J, Gilleron M, Puzo G, Erard F, Ryffel B, Quesniaux VF. (2007) Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGIRR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26014-26025.
- Flynn JL. (2004) Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 84, 93-101.
- Gagneux S, Small PM. (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implica-

- tions for tuberculosis product development. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 328-337.
- García V, Pasquinelli V, Jurado J, Alvarez I, Porto DFD. (2011) Inmunidad Antibacteriana. Introducción a la Inmunología Humana, Fainboim, L- Geffner, J. Sexta edición: 409-422.
- Geffner L, Yokobori N, Basile J, Schierloh P, Balboa L, Romero MM, Ritacco V, Vescovo M, Gonzalez Montaner P, Lopez B, et al. (2009) Patients with multidrug-resistant tuberculosis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* M and Ra strains. *Infection and Immunity* 77, 5025-5034.
- Gibbons A. (2001) Modern men trace ancestry to African migrants. *Science* 292, 1051-1052.
- Golden-Mason L, Klarquist J, Wahed AS, Rosen HR. (2008) Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *The Journal of Immunology* 180, 3637-3641.
- Gómez SA, Arguelles CL, Guerrieri D, Tateosian NL, Amiano NO, Slimovich R, Maffia PC, Abbate E, Musella RM, García VE, Chuluyan HE. (2009) Secretory leukocyte protease inhibitor: a secreted pattern recognition receptor for mycobacteria. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179, 247-253.
- Gutiérrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. (2005) Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogen* 1, e5.
- Hiemstra PS. (2002) Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society Transactions* 30, 116-120.
- Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Ishiguchi T, Okada M, Masuda M, Satoh H, Itoh H. (2005) Adenoviral E1A suppresses secretory leukoprotease inhibitor and elafin secretion in human alveolar epithelial cells and bronchial epithelial cells. *Respiration* 72, 629-635.
- Hiraki A, Aoe K, Matsuo K, Murakami K, Murakami T, Onoda T, Sugi K, Takeyama H, Eda R. (2003) Simultaneous measurement of T-helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion. *Int J Tuberc Lung Dis* 7, 1172-1177.
- Hirsch CS, Toossi Z, Johnson JL, Luzze H, Ntambi L, Peters P, McHugh M, Okwera A, Joloba M, Mugenyi P, et al. (2001) Augmentation of apoptosis and interferon-gamma production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* 183, 779-788.
- Hotamisligil G, Erbay E. (2008) Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology* 8, 923-934.
- Hua CC, Chang LC, Chen YC, Chang SC. (1999) Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest* 116, 1292-1296.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal* 11, 3887-3895.
- Jaumann F, Ellsner A, Mazur G, Döbmann S, Vogelmeier C. (2000) Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of secretory leukoprotease inhibitor expression in a bronchial epithelial cell line. *Munich Lung Transplant Group. European Respiratory Journal* 15, 1052-1057.
- Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martínez GJ, Quiroga MF, Abbate E, Musella RM, Chuluyan HE, García VE. (2008) Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *The Journal of Immunology* 181, 116-125.
- Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. (2010) Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Annals of Internal Medicine* 152, 93-100.
- Kellendonk C, Eiden S, Kretz O, Schütz G, Schmidt I, Tronche F, Simon E. (2002) Inactivation of the GR in the nervous system affects energy accumulation. *Endocrinology* 143, 2333-2340.
- La Cava A, Matarese G. (2004) The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews in Immunology* 4, 371-379.
- Langhans W. (2000) Anorexia of Infection: Current Prospects. *Nutrition* 16, 996-1005.
- Lara-Castro C, Luo NL, Wallace P, Klein RL, Garvey WT. (2006) Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55, 249-259.
- Light RW. (2010) Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 15, 451-458.

- Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, Morroni M, Baragli A, Castellucci M, Gualillo O, Muccioli G. (2009) Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system. *Cytokine Growth Factor Reviews* 20, 137-152.
- Luo BL, Niu RC, Feng JT, Hu CP, Xie XY and Ma LJ. (2008) Downregulation of Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor in Chronic Obstructive Lung Disease: The Role of TGF-beta/Smads Signaling Pathways. *Archives of Medical Research* 39, 388-396.
- MacFarlane AWt, Campbell KS. (2006) Signal transduction in natural killer cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 298, 23-57.
- Mahud C, Bay ML, Farroni MA, Bozza V, del Rey A, Besedovsky H, Bottasso OA. (2004) Cortisol and dehydroepiandrosterone affect the response of peripheral blood mononuclear cells to mycobacterial antigens during tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 60, 639-646.
- Manca C, Tsenova L, Barry CE 3rd, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *The Journal of Immunology* 62, 6740-6746.
- Mattelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglione M. (2007) Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 5, 857-871.
- Nakae S, Suto H, Iikura M, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. (2006) Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *The Journal of Immunology* 176, 2238-2248.
- Nishimura J, Saiga H, Sato S, Okuyama M, Kayama H, Kuwata H, Matsumoto S, Nishida T, Sawa Y, Akira S, et al. (2008) Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *The Journal of Immunology* 180, 4032-4039.
- Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, Marcela N, Barrera L, Capone L, Dambrosi A, di Lonardo M, Isola N, Poggi S, Vescovo M, Abbate E. (2003) Multidrug-resistant tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Disease* 9, 965-969.
- Palmero D, Ritacco V, Ruano S, Ambroggi M, Cusmano L, Romano M, Bucci Z, Waisman J. (2005) Multidrug-resistant tuberculosis outbreak among transvestite sex workers, Buenos Aires, Argentina. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9, 1168-1170.
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. (2010) Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infectious Disease* 10, 103-111.
- Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. (2011) The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism Clinical and Experimental* 60, 1500-1510.
- Qin XJ, Shi HZ, Deng JM, Liang QL, Jiang J, Ye ZJ. (2009) CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clinical Cancer Research* 15, 2231-2237.
- Rachman H, Strong M, Ulrichs T, Grode L, Schuchhardt J, Mollenkopf H, Kosmiadi GA, Eisenberg D, Kaufmann SH. (2006) Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity* 74, 1233-1242.
- Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, Dambrosi A, Lopez B, Isola N, de Kantor IN. (1997) Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *The Journal of Infectious Diseases* 176, 637-642.
- Sallenave JM. (2010) Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42, 635-643.
- Santucci N, D'Attilio L, Kovalevski L, Bozza V, Besedovsky H, del Rey A, Bay ML, Bottasso O. (2011) A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE* 6(10) e26363.
- Schierloh P, de la Barrera S, Sasiain MC. (2012) *Mycobacterium Tuberculosis* Book 3. In C. PJ (ed.), *Role of NK Cells in Tuberculous Pleurisy as Innate Promoters of Local Type 1 Immunity with Potential Application on Differential Diagnosis*, vol. 3. InTech, Croatia.
- Schierloh P, Yokobori N, Aleman M, Landoni V, Geffner L, Musella RM, Castagnino J, Baldini M, Abbate E, de la Barrera SS, Sa-

- saiain MC. (2007) *Mycobacterium tuberculosis*-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infection and Immunity* 75, 5325-5337.
- Schierloh P, Yokobori N, Aleman M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, Alves L, Abbate E, de la Barrera SS, Sasiain MC. (2005) Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *The Journal of Immunology* 175, 6852-6860.
- Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, Balboa L, Romero MM, Musella RM, Aleman M, Castagnino J, Basile J, de la Barrera SS, Abbate E, Sasiain MC. (2009) NK cells from tuberculous pleurisy express high ICAM-1 levels and exert stimulatory effect on local T cells. *European Journal of Immunology* 39, 2450-2458.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R and Freeman GJ. (2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology* 8, 239-245.
- Song CH, Lee JS, Nam HH, Kim JM, Suhr JW, Jung S, Na MJ, Paik TH, Kim HJ, Park JK, Jo EK. (2002) IL-18 production in human pulmonary and pleural tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 56, 611-618.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. (1997) Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 9869-9874.
- Stenlof K, Wernstedt I, Fjallman T, Wallenius V, Wallenius K, Jansson JO. (2003) Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 4379-4383.
- Taub D. (2008) Novel connections between the neuroendocrine and immune systems: the ghrelin immunoregulatory network. *Vitamins & Hormones* 77, 325-346.
- Turnbull AV, Rivier CL. (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Reviews* 79, 1-71.
- Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. (2006) PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of Virology* 80, 11398-11403.
- Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine* 8, 75-79.
- Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. (2000) Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1587-1600.
- Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. (2006) SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clinical Science (Lond)* 110, 21-35.
- Yamada Y, Nakamura A, Hosoda M, Kato T, Asano T, Tonegawa K, Itoh M. (2001) Cytokines in pleural liquid for diagnosis of tuberculous pleurisy. *Respiratory Medicine* 95, 577-581.
- Yokobori, N. (2010) Evaluación de la respuesta inmune frente a cepas locales de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes a drogas. Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires.
- Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. (1994) Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation* 93, 1733-1739.
- Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM. (1997) STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* 272, 30607-30610.
- Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelzer F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. (1993) The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European Journal of Immunology* 23, 2053-2058.
- Zhong X, Tumang JR, Gao W, Bai C, Rothstein TL. (2007) PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *European Journal of Immunology* 37, 2405-2410.

Inmunodeficiencias Primarias en la Argentina. Una puesta al día.

Palabras claves: Inmunodeficiencias Primarias, Registro, Infecciones Recurrentes.
Key words: Primary Immunodeficiency, Register, Recurrent Infection

Las Inmunodeficiencias Primarias (IDP) son defectos naturales del sistema inmune que han enseñado al inmunólogo básico y clínico sobre los caminos fisiológicos necesarios para un funcionamiento normal del mismo. Son consideradas enfermedades poco frecuentes, pero su mejor difusión y diagnóstico han modificado los registros actuales, teniendo algunas de ellas una incidencia que varía según las regiones entre 1 de cada 200 a 1 de cada 25.000 recién nacidos (RN) vivos. El diagnóstico diferencial de estas enfermedades se debe realizar respecto de las Inmunodeficiencias Secundarias (IDS), las que son producidas por alteraciones en el sistema inmune

relacionadas con otra enfermedad de base que lo compromete en forma similar a las IDP, en forma transitoria o permanente. El Servicio de Inmunología del Hospital Ricardo Gutiérrez (SIHNRG) ha reportado desde diciembre de 1989 al 2011, 961 IDP y se estima que en la Argentina existen más de 2000 pacientes con diferentes IDP. Estas enfermedades pueden manifestarse en la infancia, adolescencia o adultez. Los síntomas pueden ser infecciones frecuentes y/o severas, cuadros hematológicos, autoinmunes, etc., que pueden ser su única forma de manifestación. Los tratamientos dependen de cada síndrome y comprenden vacunación con gérmenes encapsulados (para deficiencias de complemento), profilaxis antibiótica (para Enfermedad Granulomatosa Crónica), administración de gammaglobulina (para deficiencias humorales), y trasplante con células progenitoras de médula ósea o terapia génica (para Deficiencias Combinadas Severas). El mejor diagnóstico y tratamiento de las IDP no sólo ha mejorado la evolución y calidad de vida de los pacientes, sino que ha bajado los costos de salud pública en lo que se refiere a los pacientes diagnosticados y tratados versus los que aún se encuentran sin diagnóstico y tratamiento adecuados. Esta suma de factores revela la importancia y la necesidad de la concientización de los profesionales de la salud para realizar los diagnósticos tempranos y correctos de los posibles casos de IDP.

Primary Immunodeficiencies (PID) are natural defects of the immune system that have taught to basic and clinical immunologists about many physiological pathways necessary for the normal functioning of the immune system. They are considered rare diseases, but their diffusion and better diagnosis have changed the current records, and it has been established that some of them have an incidence that varies by region between 1 out of 200 to 1 out of 25,000 live newborns. The differential diagnosis of these diseases from Secondary Immunodeficiencies (IDS) which are due to defects in immune system function due to a different underlying disease is critical for an accurate diagnosis and an early therapeutic intervention. The Immunology Department of "Ricardo Gutiérrez" Hospital (SIHNRG) has reported 961 PID until December 2011, and it is estimated that in Argentina there are approximately 2000 patients. These diseases can be manifested in childhood, adolescence or adulthood. Symptoms may include frequent infections and/or severe hematological pictures, autoimmune manifestations, and others, and these symptoms may be the only form of manifestation. Treatments depend on each syndrome and comprise vaccination with capsulated germs (for deficiencies of complement), antibiotic prophylaxis (for Chronic Granulomatous Disease), administration of gammaglobulin (for humoral deficiencies), stem cell transplantation obtained from bone marrows and gene therapy (for Severe Combined Deficiencies). Better diagnosis and treatments for PID not only has improved patients survival and quality of life, but has lowered the cost in public health if one compares well diagnosed and treated patients vs. misdiagnosed and untreated patients. Thus, physicians should be aware of the relevance of a correct diagnosis of possible cases of PID.

■ INTRODUCCIÓN

Las IDP representan el fracaso en la función de algún o algunos de los

componentes del sistema inmune. Son consideradas dentro de las enfermedades "raras", pero su mejor diagnóstico ha revelado en los úl-

timos años una mayor prevalencia de muchas de ellas. Publicaciones recientes han reportado una prevalencia de las IDP de 1 cada 10.000

■ Liliana Bezrodnik

Coordinadora del Grupo de Inmunología del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez".
Directora del Centro Jeffrey Modell Argentina
Ciudad de Buenos Aires, Argentina
lbezrodnik@yahoo.com.ar

recién nacidos, la misma puede diferir según los diferentes grupos étnicos y países. En la mayoría de los registros de IDP la Deficiencia Selectiva de Ig A (DSA) se reporta como la más frecuente (1 de cada 700 recién nacidos vivos), seguida por la Enfermedad de Di George (SDG) y la Inmunodeficiencia común variable (IDCV) con 1 de cada 4.000 recién nacidos vivos y 1 de cada 25.000 recién nacidos vivos, respectivamente.

Con el objeto de realizar el estudio de un paciente sospechado de padecer una IDP es necesario primero realizar un diagnóstico diferencial con las inmunodeficiencias secundarias (IDS). Las IDS se deben a defectos del sistema inmune relacionadas con otras enfermedades de base, ya sean transitorios o permanentes. En general, en casos de IDS se debe solucionar la enfermedad que produce tal compromiso inmunológico pero en muchos casos, las IDS requieren del o de los mismos tratamientos que las IDP y muchas veces el tratamiento debe ser instaurado de por vida.

La difusión actual de los conocimientos de la inmunología básica entre la comunidad médica y el avance de técnicas moleculares para el diagnóstico ha permitido un mayor reconocimiento de estas entidades, lo que ha contribuido a una mejor definición de las IDP. El diagnóstico molecular ha permitido describir más de 150 síndromes bien definidos. Por otra parte, estas enfermedades han revolucionado el pensamiento médico clínico y científico pues representan modelos naturales espontáneos de seres humanos deficientes en un gen que conduce a mecanismos inmunopatogénicos que dejan al paciente susceptible a padecer múltiples infecciones, alergias, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, síndromes linfoproliferativos y/o cáncer. Por otra parte, la elucidación de las

vías afectadas a través de diagnósticos moleculares y ensayos funcionales con células de los pacientes ha contribuido al conocimiento y/o validación en seres humanos de nuevos procesos inmunológicos que previamente sólo se habían conocidos en animales de laboratorio a partir del empleo de ratones genéticamente manipulados.

■ CLASIFICACIÓN

En noviembre del 2011 el Grupo Europeo de IDP (ESID) junto a la

Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS), modificaron la clasificación de las IDP de acuerdo al defecto molecular encontrado y relacionado con el compromiso inmune clínico y de laboratorio. No obstante, la nueva clasificación se encuentra sujeta a revisión permanente y continuos cambios debidos a los nuevos diagnósticos realizados cada año (**Tabla 1**). Es importante destacar que si bien varios pacientes presentan signos y síntomas clínicos y parámetros del laboratorio inmunológico alterados que permi-

Tabla 1 Clasificación de IDP	
Categoría de la enfermedad	Diagnóstico
Inmunodeficiencia Combinada de células T y B	Inmunodeficiencia Combinada Severa Síndrome de Ommen Deficiencia de ADA Deficiencia HLA- II Síndrome de Hiper IgM (CD40 L y CD40)
Síndromes bien definidos con inmunodeficiencia	Síndrome de Wiskott Aldrich Síndrome de Hiper IgE Enfermedad Hepática Venó-Oclusiva con Inmunodeficiencia
Deficiencia predominantemente de anticuerpos	Deficiencia selectiva de IgA Agammaglobulinemia Inmunodeficiencia Común Variable AID y UNG
Enfermedades por inmunodisregulación	Inmunodeficiencia Primaria asociada a Poliendocrinopatía Ligado al X (IPEX) Síndrome de Hermansky-Pudlak Síndrome Linfoproliferativo ligado al X (XLP) Síndrome Linfoproliferativo Benigno (ALPS)
Defecto del fagocito	Enfermedad Granulomatosa Crónica Defecto Moléculas de Adhesión Síndrome de Schwachman-Diamond
Defectos de la Inmunidad innata	Candidiasis Mucocutánea Crónica Defecto de la vía IFNgamma/IL12 (MSMD) Deficiencia de NEMO
Síndromes Autoinflamatorios	Fiebre Periódica Hereditaria
Deficiencia de complemento	Angioedema Hereditario

De: Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. IUIS classification of primary immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology*, November 2011 | Volume 2 | Article 54 | **2**.

ten sospechar un compromiso de su inmunidad innata y/o adaptativa, debido a que aún no se han hallado los genes deficientes involucrados, estos cuadros se encuentran dentro del grupo de IDP sin clasificar.

■ ¿CUÁNDO SE DEBE SOSPECHAR IDP?

Uno de los primeros aspectos a considerar es la existencia de antecedentes familiares que nos orienten y permitan buscar las IDP. En la actualidad, la existencia de estos antecedentes familiares ha permitido identificar estas enfermedades durante el período prenatal o en el recién nacido por medio de técnicas moleculares, búsqueda de alteraciones citogenéticas y/o observación de defectos celulares. El diagnóstico temprano de las IDP puede prevenir y disminuir las complicaciones severas y permite la instauración de terapias que pueden curar al paciente. Basado en un diagnóstico molecular, es posible además realizar el consejo genético a los padres acerca del riesgo de tener otro hijo que padezca la misma IDP, permite el diagnóstico de IDP aún antes del nacimiento y, así, establecer la mejor estrategia para tratar inmediatamente al niño afectado, disminuyendo la morbimortalidad.

Además de los antecedentes familiares, existen signos de alarma que han sido presentados por diversos grupos (<http://www.info4pi.org/aboutPI/pdf/General10WarningSignsFINAL.pdf>). Éstos varían según los autores y las regiones entre 10, 12, 14 (SIHNRG) y 20 signos (The Jeffrey Modell Foundation warning signs for PID), y los mismos se encuentran resumidos en la **Tabla 2**.

Desde el pensamiento clínico, la sospecha de las IDP nos permite pensar estas enfermedades como:

Tabla 2.

Signos de alerta de las Inmunodeficiencias Primarias (IDP).

Las **IDP** generan en niños y adultos una mayor susceptibilidad a presentar infecciones que por lo general se reiteran y/o son de difícil curación. En Argentina se han registrado más de 1400 individuos que sufren alguna de las más de 120 diferentes IDP. Si Ud. o alguien que Ud. Conoce **presentó 2 o más de los siguientes signos de alerta**, consulte con su médico para determinar si es posible que se trate de una Inmunodeficiencia Primaria (*Centro Jeffrey Modell Argentina*).

SIGNO 1

Cuatro o más infecciones nuevas en el oído (otitis) en 1 año.

SIGNO 2

Dos o más sinusitis graves en 1 año.

SIGNO 3

Dos o más meses tomando antibióticos con poca mejoría.

SIGNO 4

Dos o más infecciones pulmonares (neumonías) en 1 año o una por año consecutivo.

SIGNO 5

Dificultades para crecer o aumentar de peso normalmente.

SIGNO 6

Abscesos (colección de pus) recurrentes por debajo de la piel o en órganos.

SIGNO 7

Infección por hongo (Candidiasis / Muguet) persistente en la boca o en la piel después del año de vida.

SIGNO 8

Necesidad de antibióticos endovenosos para curar una infección.

SIGNO 9

Enfermedades hematológicas de causa no clara (anemia, citopenias).

SIGNO 10

Una o más infecciones profundas o severas.

SIGNO 11

Diarrea persistente o crónica con pérdida de peso de causa no conocida.

SIGNO 12

Episodio o enfermedad autoinmune (ataque inmune a algo propio del cuerpo).

SIGNO 13

Ciertas infecciones virales a repetición (Herpes, Condilomas).

SIGNO 14

Algún familiar con Inmunodeficiencia Primaria.

Posible: Cuando existen datos clínicos y/o del laboratorio que nos inducen a comenzar a evaluar al paciente.

Probable: basados en datos del laboratorio inmunológico que avallan la posibilidad (por ejemplo, la ausencia de anticuerpos y/o la presencia de antecedentes familiares).

Definitivo: en base a estudios moleculares y/o antecedentes de familiares de varones afectados (por ejemplo, un tío con Agammaglobulinemia).

Las manifestaciones clínicas se presentan con mayor frecuencia en la infancia (durante las primeras horas de vida, segundo semestre de vida y primera infancia) pero también en niños mayores, adolescentes e inclusive en la vida adulta. Las formas de presentación clínica dependen del área inmune comprometida. Pacientes con deficiencias severas, con compromiso celular y humoral, son susceptibles a infecciones por gérmenes comunes y oportunistas. Las deficiencias humorales pueden manifestarse con infecciones frecuentes de la infancia, otitis media, sinusitis, bronquitis, neumonías recurrentes, que en general responden a los antibióticos, pero al suspenderlos se repite el cuadro. Gérmenes oportunistas o sepsis, meningitis pueden ser también la primera manifestación del huésped con IDP. Asimismo, las IDP también pueden manifestarse como síndromes autoinmunes atípicos, asma grave y citopenias.

■ ¿CÓMO Y CUÁNDO SE INICIA EL ESTUDIO DE UNA POSIBLE IDP?

En base a datos clínicos, antecedentes personales y/o familiares y parámetros del laboratorio (hemograma con linfopenia u otras cito-

penias, proteinograma con descenso de las gammaglobulinas totales, etc.), el médico debe sospechar la presencia de una IDP.

Los estudios inmunológicos, deben realizarse por profesionales técnicos y bioquímicos entrenados. Todos los estudios se realizarán teniendo en cuenta la edad del paciente, comparando los valores obtenidos con tablas de valores normales para individuos de la misma edad y sexo.

Los estudios se basan en un primer *screening* de rutina que nos va a orientar para comenzar el estudio inmunológico específico asociado siempre a la clínica: hemograma completo, recuento de linfocitos, recuento de neutrófilos, recuento de eosinófilos, recuento de plaquetas, hemoglobina, morfología celular, granulaciones, volumen plaquetario, análisis de infección por VIH tipo I y II (serología o en pacientes con hipogammaglobulinemia o falta de función de anticuerpos se deber realizar la búsqueda del antígeno o de ácidos nucleicos virales por PCR).

La valoración inmunológica se basará en una valoración de la respuesta inmune humoral (cuantitativa y funcional), la evaluación de la vía del complemento (determinación cuantitativa y actividad lítica del complemento), la valoración de la respuesta inmune celular (cuantitativa y funcional), la valoración del sistema fagocítico, las vías del Interferón-gama y otras (**Tabla 3**).

La evaluación del sistema inmune debe ser siempre cuali-cuantitativa. Para hablar de un sistema competente debemos saber si además de tener los anticuerpos y las células, éstas funcionan correctamente frente a antígenos específicos y/o inespecíficos. Para ello, nos valemos del plan de vacunación al que están sometidos los pacientes y analizamos

la respuesta a los antígenos vacunales (polisacáridos bacterianos, toxoides tetánico y diftérico, etc.).

■ TRATAMIENTO DE LAS IDP

La mayoría de las IDP son enfermedades extremadamente severas que requieren una rápida intervención terapéutica. Los tratamientos de las IDP pueden dividirse en paliativos o curativos.

En niños con deficiencia humoral por falta en la cantidad y/o función de los anticuerpos, los tratamientos varían según el tipo de deficiencia y el compromiso clínico. En pacientes asintomáticos alcanza sólo con un control médico periódico y en varios casos no requieren tratamiento específico (tal como son las deficiencias selectivas de IgA o DSA). Los síntomas de alergia se pueden tratar con antihistamínicos (en casos de DSA), vacunación con gérmenes encapsulados (en casos de deficiencias del complemento o DC y en casos de deficiencia funcional de anticuerpos o DFA), y profilaxis antibiótica (en casos de DC, DFA o Enfermedad Granulomatosa Crónica o EGC). Pacientes con falta total o parcial de los anticuerpos y sin función anticorpórea se tratan con gammaglobulina de uso endovenoso (GEV) cada 28 días o subcutánea una vez por semana (GSB), entre 150-200 mg/Kg por dosis. Aunque la dosis indicada y la frecuencia de la infusión dependen de cada paciente, lo que hoy se requiere es llegar a niveles plasmáticos de gammaglobulina por encima de 700 mg/dl. Por otra parte, las DSA puras, no se tratan con gammaglobulina.

Las deficiencias combinadas severas (DCS) son urgencias inmunológicas y el tratamiento de base curativo es el trasplante de células progenitoras de médula ósea. En el momento de diagnosticar la DCS se

Tabla 3. Laboratorio Inmunológico para descartar IDP		
Compartimento	Cuantitativo	Funcional*
Valoración humoral	<p>Dosajes de inmunoglobulinas séricas: IgG, IgA, IgM, IgE, Proteinograma electroforético Clearance de $\alpha 1$ antitripsina. <i>En niños mayores de dos años:</i> Dosajes subclases de IgG: IgG1 IgG2 IgG3 IgG4. Cuantificación por citometría de flujo de linfocitos B: células CD19⁺ o CD20⁺.</p>	<p>Dosaje de Anticuerpos naturales: isohemaglutininas (en niños mayores de 6 meses), anticuerpos inducidos por agentes infecciosos (ASTO, anticuerpos contra agentes virales, etc) o por vacunaciones (Anticuerpos contra Toxoide Tetánico luego de las tres dosis de la vacuna cuádruple, Anticuerpos contra agentes virales luego del año de edad, Anticuerpos contra polisacáridos del neumococo en niños mayores de dos años).</p>
Vía del complemento	<p>Dosajes de C3 y C4. Dosaje de C1 inhibidor. Determinación del resto de los componentes e inhibidores.</p>	<p><i>Actividad lítica del complemento</i> Vía clásica (CH50). Vía alterna (AH50).</p>
Valoración celular	<p>Determinación de poblaciones linfocitarias (células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK, CD20⁺). Evaluación de compartimento de los linfocitos T y B (Poblaciones linfocitaria extendidas).</p>	<p>Pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada en niños vacunados o con antecedentes de contacto con antígeno: PPD, candidina, trychophyton, Toxoide Tetánico, Toxoide Diftérico. Proliferaciones linfocitarias en respuesta a mitógenos y antígenos específicos. Valoración enzimática y de proteínas en casos puntuales: ADA, PNP, HLA-DR (molécula de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad), moléculas coestimuladoras (CD40L, ICOS, TACI).</p>
Valoración del sistema fagocítico	<p>Hemograma: recuento de neutrófilos, análisis de morfología celular. Ensayo de quimiotaxis. Ensayo de estallido respiratorio: consumo de O₂ (quimioluminiscencia, producción superóxido) por reducción del nitrobluetetrazolium (NBT) o dihidrorodamina (DHR; análisis por citometría de flujo). Expresión de moléculas de adhesión (CD11b/CD18; CD15) por citometría de flujo. Análisis de actividad enzimática: mieloperoxidasa (MPO), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), NADPH oxidasa.</p>	
Vía del Interferón-gama	<p>Análisis de expresión del receptor de Interferón-gama e IL-12. Análisis de expresión de STAT1, STAT4, Nemo.</p>	<p>Estudio de la funcionalidad de la vía.</p>

*Biología molecular: SSCP, secuenciación- Diagnóstico de Certeza

debe comenzar con un tratamiento paliativo y aislando al paciente en habitaciones que deben contar con flujo laminar hasta la realización del trasplante. En niños no infectados con citomegalovirus se debe suprimir la lactancia por la posibilidad que la madre sea portadora del virus y lo transmita a su hijo a través de la leche materna. Los alimentos para el paciente deben ser todos cocidos. Se suele instaurar terapia sustitutiva con GEV, profilaxis antibiótica, antimicótica y drogas tuberculostáticas en caso de que el paciente haya recibido la vacuna BCG. Si el paciente requiere transfusiones las mismas deben ser realizadas empleando sangre irradiada para prevenir la reacción de injerto contra huésped.

El tratamiento curativo como se dijo en párrafos anteriores es el trasplante de células progenitoras de médula ósea. Dependiendo de la IDP, los pacientes podrán ser tratados con trasplante de células haploidenticas (de alguno de los padres) o trasplante de células alogéneas de médula ósea, pudiendo ser de donante relacionado (familiar) o no relacionado. El trasplante puede realizarse empleando células progenitoras de médula ósea, de sangre periférica o de cordón umbilical.

La sobrevida de los pacientes así como la disminución de la incidencia y severidad de las reacciones de injerto contra huésped alcanzadas en los últimos años se ha debido a los avances realizados en los regímenes condicionantes. Muchos de ellos producían efectos adversos severos en el transcurso de la recuperación de los pacientes ocasionando una segunda enfermedad, por lo cual se han buscado regímenes condicionantes menos tóxicos. Actualmente y dependiendo de los diferentes síndromes que puede presentar el paciente, se indican tratamientos con la menor cantidad de

drogas que produzcan toxicidad y de esta manera se trata de disminuir las complicaciones futuras en estos niños.

Nuestro grupo ha realizado 24 indicaciones de trasplante de células progenitoras en niños con IDP graves: 5 con DCS, 5 con síndrome de Wiskott Aldrich, 2 con síndrome linfoproliferativo autoinmune o ALPS, 1 con síndrome de cartílago pelo con DCS, 4 con deficiencia en CD40 ligando, 1 con EGC, 1 con Deficiencia de $IKK\alpha$, 1 con disregulación inmune con poliendocrinopatía y enteropatía asociado al cromosoma X (IPEX), 4 con deficiencias celulares severas. En 6 pacientes se realizó un trasplante de células progenitoras histoidéntico relacionado (donde el donante fue una hermana o un hermano) y en 17 casos se realizó un trasplante con donantes no relacionados (7 fueron trasplantes de médula ósea, 5 fueron trasplantes de células CD34⁺ de sangre periférica y 5 fueron trasplantes de células CD34⁺ de cordón umbilical).

La terapia génica es hoy uno de los caminos más promisorios en el tratamiento de estos síndromes. Comparado con el tratamiento convencional (trasplante de células progenitoras), la terapia génica podría ofrecer una opción terapéutica menos tóxica y más específica para las IDP.

Otras IDP requieren profilaxis antibiótica y/o antimicótica y/o inmunomoduladores (tal como la EGC). Como inmunomoduladores se utiliza, por ejemplo, el interferón gama.

■ REGISTRO DE IDP

La creación y mantenimiento actualizado de Registros de IDP es fundamental para conocer la prevalencia, características y evolución

de estas patologías en cada país y regiones, ya que muchas de ellas se encuentran influenciadas por características étnicas.

Los nuevos datos acerca de la incidencia real de las IDP publicados a partir de estudios más profundos de estos síndromes enfatiza la importancia de la educación médica acerca de estas enfermedades y de la difusión de las distintas formas de presentación. No sólo las infecciones recurrentes, graves, de evolución tórpida y causada por gérmenes oportunistas son manifestaciones que deben hacer sospechar la presencia de una IDP sino que las mismas pueden presentarse y/o manifestarse con síntomas alérgicos y/o enfermedades autoinmunes y/o oncológicas y/o con linfoproliferación. Esto amplía considerablemente el espectro de síntomas y signos de alarma para el pediatra y la población en general como para justificar la realización de estudios inmunológicos subsiguientes. A partir de estas nuevas conductas y acciones concretas, el análisis de la información y las acciones de trabajo a partir de los datos evaluados de los rastreos se ha mejorado notablemente la calidad de vida de los pacientes.

Además, los registros aportan la información necesaria para poder interesar a los diversos gobiernos en la existencia y problemática de estas enfermedades, permitiendo la creación de leyes que regulen la atención y tratamiento de las IDP. En nuestro país se inició el Registro Argentino de IDP en 1994 con el propósito fundamental de conocer la epidemiología de estas enfermedades en nuestro medio. En 2001 se publicó un primer reporte del mismo que comprendía los 652 casos diagnosticados en Argentina entre 1984 y 1999. El mismo se ha llevado a cabo hasta el 2005, donde se reportaron 1319 casos de IDP. El

74% de los casos fueron de la Capital Federal y Gran Buenos Aires, le siguieron las Provincias de Santa Fe (8,9%), Mendoza (3,6%) y Entre Ríos (2,7%). Se confirmaron diagnósticos por biología molecular en 184 pacientes de todo el país entre 1995 y 2005 (24). Nuestro trabajo demostró que en la Argentina existe un alto grado de subregistro y subdiagnóstico de estas entidades. Esta información también fue incluida en los dos reportes del registro de inmunodeficiencias primarias del Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias Primarias (LAGID).

Lamentablemente, en la Argentina se ha dejado de realizar el Registro Nacional de IDP y cada centro ha comenzado desde el 2009 a reportar sus casos al Registro de IDP de la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID). El mismo se creó con el objetivo de poder establecer la prevalencia de IDP en Latinoamérica y así estimular la difusión y diagnóstico de las mismas, interesar a los diferentes gobiernos de la región para que instauren políticas de salud pública que protejan a los pacientes y regulen a las industrias farmacéuticas en la provisión de los diversos tratamientos (<http://deficiencia.unicamp.br:8080/>). Para llevarlo a cabo LASID recibió de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) la donación de un software para la confección de su registro. Por otra parte, el SIHNRG fue creado el 1 de diciembre de 1989 y ha registrado hasta diciembre del 2011, 961 casos de IDP (Figura 1).

■ CENTROS DE ATENCIÓN Y DIAGNÓSTICO EN LA ARGENTINA

En la Argentina, los centros de atención de pacientes con IDP se concentran en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Existen 2 hospitales pediátricos de alta complejidad

desde la atención médica y diagnóstica: el Hospital Nacional de Pediatría "Juan P. Garrahan" y el Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". En el primero se realizan técnicas de biología molecular, mientras que en el segundo se realiza estudios completos de la vía de complemento y de anticuerpos anti-serotipos específicos del neumococo.

Otros centros donde se realizan estudios básicos de pacientes sospechados de padecer IDP son el Hospital de Niños "Pedro de Elizalde", el Hospital Italiano y el Hospital "Carlos Durand". En este último se atienden pacientes adultos.

En el interior del país existen centros con atención médica pero con laboratorios de baja complejidad. Tal es el caso de los hospitales "Sor María Ludovica" de La Plata, "Materno Infantil" de Mar del Plata, "Víctor J. Vilela" de Rosario, "Del Niño Jesús" de Córdoba y "Humberto Notti" de Mendoza, según datos presentados en la reunión de expertos en IDP de Latinoamérica (LATAM), Colombia, Octubre 2009.

■ LA ESPECIALIDAD "INMUNOLOGÍA" EN LA ARGENTINA.

La especialidad en Inmunología Clínica para los profesionales médicos era otorgada por el Ministerio de Salud de la Nación, mediante los antecedentes curriculares de los profesionales en área de salud además de un examen con la modalidad oral y escrito. La especialidad fue eliminada como tal en nuestro país por el Dr. Lombardo, Ministro de Salud Pública de la Nación durante la presidencia del Dr. Fernando de la Rúa, hecho controvertido dado que se contradice con el crecimiento de la especialidad en el mundo y en la región.

Es un desafío para los inmunólogos de la Argentina poder lograr el reconocimiento por parte de las autoridades correspondientes. Esto permitirá no sólo la protección de los pacientes por medio de leyes, sino que los diferentes campos de la especialidad tanto básica como clínica podrán ser correctamente regulados.

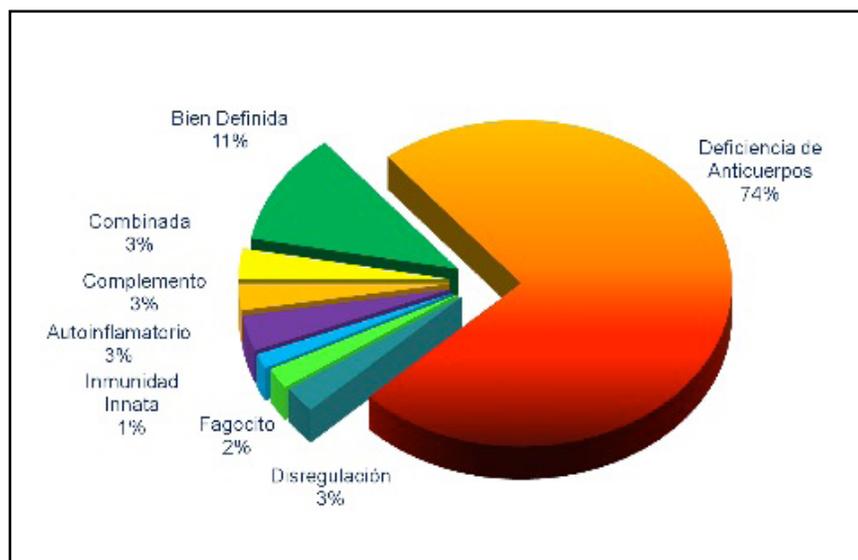


Figura 1. Distribución de IDP diagnosticadas en el SIHNRG (961 casos entre diciembre 1989 y 2011). IDCS: Inmunodeficiencia combinada; SBD: Deficiencia asociado a síndrome bien definidos; DH: Deficiencias humorales; EF: Enfermedad del fagocito; DI: Deficiencias de la Inmunidad Innata; AI: Síndromes auto inflamatorios; DC: Deficiencia del complemento; SI: Síndrome no clasificados.

Es un requisito importante para la formación de los profesionales en inmunología clínica el entrenamiento en centros reconocidos con la modalidad de las residencias básicas y posbásicas así como de becas.

■ LEYES EN LA ARGENTINA PARA IDP

En el 2004 el Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires promulgó la ley 1416 para el "diagnóstico y tratamiento de las IDC y otros". La misma fue modificada en el 2007 con la finalidad de ampliar las patologías incluidas en la primera ley y regular los diversos tratamientos de estos pacientes.

En el 2011, el Ministerio de Salud de la Nación aprobó la ley 26.689, que abarca a todas las enfermedades raras, donde se han incluido a las IDP. Sin embargo, la misma aún no ha sido reglamentada. Es un paso muy importante para los enfermos, aunque consideramos a las IDP como enfermedades poco frecuentes y no raras, el estar incluidos en esta ley ya que esto constituye un primer paso para hacer visible frente a la Salud Pública y las obras sociales a nuestros pacientes.

■ TRABAJOS DE DIFUSIÓN

La Sociedad Argentina de Inmunología, no sólo por medio de su Reunión Anual sino por medio de diferentes cursos realizados por varios de sus miembros, muestra la labor de inmunólogos básicos y clínicos en el país. Además, existe la asociación de ayuda a pacientes con IDP y sus familiares en la Argentina (www.aapidp.com.ar). Por otra parte, durante los últimos 9 años el SIHNRG ha dictado un curso de posgrado en Inmunología Clínica, en donde se trató de unir los mecanismos fisiológicos del SI y demostrar como su alteración se

manifiesta como enfermedad. El mismo se dicta actualmente en la Web como un curso multimedia <http://www.facebook.com/profile.php?id=100002979141856>.

Además hemos creado desde el 2009 una forma de comunicación didáctica por medio de juegos teatrales (obra de clown) para los pacientes, familiares y comunidad, en donde se trata de explicar el funcionamiento del sistema inmune y qué son las IDP (<http://www.facebook.com/pages/Inmunodeficiencias-Primarias-en-la-Argentina-Dra-Bezrodnik-y-equipo/264638180278073>). En mi caso, además he escrito un libro de cuentos sobre el sistema inmune llamado "El señor SI", como otra forma de difusión y de fácil comunicación con la población general (ISBN: 978-987-26512-06).

■ CENTRO JEFFREY MODELL EN LA ARGENTINA

Desde agosto del 2011, la Fundación Jeffrey Modell (FJM) creó un centro para la difusión de las IDP en la Argentina y eligió al SIHNRG como sede. La FJM fue creada en Estados Unidos hace 25 años por Fred y Viki Modell, tras la muerte de su hijo Jeffrey quien padecía una IDP. Hoy, con más de 60 centros en el mundo, realiza un fuerte apoyo a profesionales que trabajan en la especialidad con la finalidad de mejorar los diagnósticos, las investigaciones, los tratamientos y la difusión de estos síndromes.

■ COMENTARIOS FINALES

Las IDPs, son enfermedades complejas y severas, pero las que con un diagnóstico precoz y tratamiento adecuado, permiten la sobrevivencia de los pacientes. Además, en trabajos realizados por la FJM se ha demostrado que existe un ahorro sustancial de costos para los pacien-

tes diagnosticados en comparación con los no diagnosticados.

El trabajo interdisciplinario en hospitales de alta complejidad entre el pediatra, el médico clínico, los diversos especialistas y el inmunólogo hoy es fundamental para el diagnóstico y seguimiento de las IDP. Este trabajo colaborativo se ha visto reflejado en estos últimos 6 años en nuestro servicio, en donde hemos observado un incremento de un 20 al 30% anual en la consulta y diagnóstico de pacientes con diversas IDP. Es un deber de los médicos sospechar la presencia de IDP y detectarlas a tiempo y correctamente con el objeto de permitir a los pacientes convivir con las mismas en el mejor estado de salud.

■ BIBLIOGRAFÍA

- Abinun M., Gennery A.R. (2008) Long-term immune reconstitution after anti-CD52-treated or anti-CD34-treated hematopoietic stem cell transplantation for severe T-lymphocyte immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 121, 361-367.
- Al-Herzi W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.C., Cunningham-Rundles C.H., Etzioni A., Fischer A., Franco J.L., Geha R., Hammarström L., Nonoyama S., Notarangelo L., Ochs H., Puck J., Roifman C.H., Seger R., Tang M. (2011) Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. IUIS classification of primary immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology.* 2, 1-26.
- Boyle J.M., Buckley R.H. (2007) Population Prevalence of Diagnosed Primary Immunodeficiency Diseases in the United States. *J Clin Immunol.* 27, 497-502.

- Cooper M.A., Pommering T., Korányi L. (2003) Primary Immunodeficiencies. *Am Family Physician*. 68, 2001-2008.
- Chinen J., Sheare W. (2010) Advances in basic and clinic immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 127, 336-341.
- Eades-Perner A.M., Gathmann B., Kneerr V., Guzman D., Veit D., Kindle G. and Grimbacher B. (2007) For the European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: Results 2004-06. A.-M. ESID. Registry Working Party British Society for Immunology, *Clin Exp Immunol*. 147, 306-312.
- Fischer A. (2004) Human primary immunodeficiency disease: a perspective. *Nat Immunol*. 5, 23-30.
- Fischer A. (2007) Human primary immunodeficiency disease: a perspective. *J Clin Immunol*. 27, 497-502.
- Fischer A., Hacein-Bey-Abina S., Pharm D., Cavazzana-Calvo M. (2011) Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 127, 1357-1359.
- Freeman A.F., Holland S.M. (2009) Antimicrobial prophylaxis for primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy and Clin Immunol*. 9, 525-530.
- Gathmann B., Binder N., Ehl St., Kindle G. for the ESID Registry Working Party. (2012) The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin Exp Immunol*. 167, 479-491.
- Geha R., Notarangelo L., Casanova J.L., Chapel J., Conley M.E., Fisher A., Hammarstrom L., Nonoyam S., Ochs H., Puck J., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. (2009) Primary Immunodeficiency diseases Classification Committee: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 120, 776-785.
- Griffith, L.M., Cowan M.J., Notarangelo L.D., Puck J., Buckley R., Candotti F., Conley M.E., Fleisher T., Gaspar B., Kohn D., Ochs H., O'Reilly R., Rizzo J.D., Roifman C.H., Small R.N., Shearer W.T. (2009) Improving cellular therapy for primary immune deficiency diseases: Recognition, diagnosis, and Management. *J Allergy Clin Immunol*. 124, 1152-1160.
- Grupo de Inmunología Pediátrica. (2007) Registro argentino de inmunodeficiencias primarias. Segundo informe. *Arch Arg Pediatr*. 105, 453-460.
- Grupo de Trabajo de Inmunología Pediátricas. (2011) Guías de manejo: medidas generales de prevención de infecciones y quimioprofilaxis en las inmunodeficiencias primarias. *Arch Arg Pediatr*. 109, 267-273.
- International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies. (2009) Primary Immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*. 124, 1161-1178.
- International Union of Immunological Societies report on immunodeficiency disease: an update. (2003) *Clin Exp Immunol*. 132, 9-15.
- Leiva L.E., Bezrodnik L., Oleastro M., Condino-Neto A., Costa-Carvalho B. T., Sevciovic Grumach A., Espinosa-Rosales F.J., Franco J.L., Kingi A., Inostroza J., Quezada A., Porras O., Sorensen R.U. (2011) Primary immunodeficiency diseases in Latin America: Proceedings of the Second Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID) Advisory Board. *Allergol Immunopathol*. 39, 106-110.
- Leiva L.E., Zelazko M., Oleastro M., Carneiro-Sampaio M., Condino-Neto A., Costa-Carvalho B.T., Grumach A.S., Quezada A., Patiño P., Franco J.L., Porras O., Rodríguez F.J., Espinosa-Rosales F.J., Espinosa-Padilla S.E., Allmíategui D., Martínez C., Tafur J.R., Valentín M., Benarroch L., Barroso R., Sorensen R.U. (2007) Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol*. 27, 101-108.
- Lenardo J.M., Puck J. and Fleisher T.H., Bleesing J., Brown M., Straus S. E, Dale J.K., Siegel R.S. (2011) Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 98, 2466-2473.
- Modell V., Gee B., Lewis D.B., Orange J.S., Roifman C.M., Routes J.M., Sorensen R.U., Notarangelo L.D., Modell F. (2011) Global study of primary immunodeficiency diseases (PI) diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol Res*. 51, 61-70.
- Notarangelo L.D., Forino C., Mazzolari E. (2006) Stem cell transplantation in primary immunodeficiencies. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 6, 443-448.
- Pessach I.M., Ordovas-Montanes J., Shen-Ying Zhang B.A., Casanova J.L., Giliani S., Gennery A.R., Al-Herz W., Mano P.D., Schlaeger T. M., Park I.H., Rucci F., Agarwal S., Mostoslavsky G., Daley G.Q., Notarangelo L.D. (2011) Induced pluripotent stem cells: A novel frontier in the study of human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 127, 1400-1407.
- Pessach I.M., Notarangelo L.D. (2011) Gene therapy for primary immunodeficiencies: Looking ahead, toward gene correction. *J Allergy Clin Immunol*. 127, 1334-1350.
- Orange J., Grossman W., Navickis R., Wilkes M. (2010) Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical Studies. *Clin Immunol*. 137, 21-30.

Rezaei N., Bonilla F.A., Vries E., Orange J. (2008) An Introduction to Primary Immunodeficiency Diseases. *Pediatr Allergy, Asthma Immunol.* 1, 1-22.

Samarghitean C., Ortutay C. and Vihinen M. (2009) Pathological, and Laboratory Parameters Immunodeficiencies

Based on Clinical, Systematic Classification of Primary. *J Immunol* 183, 7569-7575.

Stiehm E.R., Ochs H., Winkelstein J. (2004) Immunologic disorders in infants and children. *Genetically Determined Immunodeficiency Diseases.* 5ª

Ed. Filadelfia: Elsevier Saunders. Cap 1, 3-33.

Vries E. and Driessen G. (2011) Educational paper. Primary Immunodeficiencies in children: a diagnostic Challenge. *Eur. J Pediatr.* 170, 169–177.

2012

prêmio MERCOSUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA **premio MERCOSUR DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

Inovação tecnológica na saúde **Innovación tecnológica en salud**

A Reunião Especializada em Ciência e Tecnologia do MERCOSUL (RECYT), com o patrocínio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI/Brasil) e a parceria do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) e do Movimento Brasil Competitivo (MBC), convida estudantes e pesquisadores para concorrer ao Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia – Edição 2012, cujo tema é "Inovação tecnológica na saúde". Os candidatos deverão se inscrever em uma das seguintes categorias: "Iniciação Científica", "Estudante Universitário", "Jovem Pesquisador" e "Integração". Os trabalhos devem ser enviados à UNESCO, até 9 de julho de 2012.

La Reunión Especializada de Ciencia y Tecnología del MERCOSUR (RECYT), con el patrocinio del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Brasil (MCTI/Brasil) y con el apoyo del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq/Brasil), de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y del Movimiento Brasil Competitivo (MBC), invita a estudiantes e investigadores para concursar al Premio MERCOSUR de Ciencia y Tecnología – Edición 2012, cuyo tema es "Innovación tecnológica en salud". Los candidatos deberán inscribirse en una de las siguientes categorías: "Iniciación Científica", "Estudiante Universitario", "Joven Investigador" e "Integración". Los trabajos deben ser enviados a la UNESCO, hasta 9 de julio de 2012.

O regulamento completo está disponível no site: <http://eventos.unesco.org.br/premiomercosul>

El reglamento completo está disponible en el sitio: <http://eventos.unesco.org.br/premiomercosul>

PATROCÍNIO PATROCINIO



ORGANIZAÇÃO ORGANIZACIÓN



Representação no Brasil



Transmisión sexual del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1): papel de las células dendríticas

Palabras claves: HIV-1, Células Dendríticas, Semen.
Key words: HIV-1, Dendritic cells, Semen.

El HIV-1 es transmitido, en primer lugar, a través de las relaciones sexuales. A fin de concretar su transmisión el HIV-1 debe atravesar la barrera epitelial y alcanzar a las células blanco de la infección presentes en el epitelio y en el subepitelio: los linfocitos T CD4, los macrófagos y las células dendríticas (CDs). Estos tres tipos celulares expresan el receptor (CD4) y los correceptores (CCR5 o CXCR4) requeridos por el HIV-1 a fin de infectar una célula. Los mecanismos moleculares subyacentes a la transmisión sexual del HIV-1 no son aún comprendidos con claridad. Sin embargo, en los últimos años, numerosas evidencias han sugerido un papel crítico para las CDs. El HIV-1, mediante complejos mecanismos, parece utilizar a las CDs a fin de propagarse en el individuo recientemente infectado. Por otra parte, observaciones de diferentes grupos han evidenciado que el semen, no sólo actúa como vector principal en la transmisión sexual del HIV-1, sino que también pone en juego diferentes mecanismos que modulan la permisividad inicial a la infección por HIV-1.

■ Juan Sabatté(1),
Ezequiel Dantas (1),
Antonela Merlotti (1),
Heidi Gonzalez (1),
Pehuén Pereyra (1),
Natalia Sio (1),
Ana Ceballos (1),
Mercedes Cabrini (1),
Jorge Geffner (1).

(1) Centro Nacional de Referencia para el SIDA,
Facultad de Medicina, UBA.
jsabatte@fmed.uba.ar

Unprotected sexual intercourse between discordant couples is by far the most common mode of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission. After deposition of HIV-1 on the recipient mucosa, infectious virus must cross the mucosal epithelium and interact with CD4 T lymphocytes, macrophages, and dendritic cells (DCs), which are the initial targets of the infection. These cells express the receptor (CD4) and the coreceptors (CCR5 or CXCR4) required for HIV-1 infection. The capacity of HIV-1 to hijack DCs appears to be crucial for viral transmission and early HIV-1 pathogenesis. HIV-1 subverts DC function favouring the dissemination of the virus in the early steps of the infection. On the other hand, recent findings support the notion that the semen is not only a vehicle for HIV-1 transmission. It displays a variety of mechanisms able to modulate the initial spread of the infection.

■ INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en el año 2009 que 33 millones de personas viven infectadas por HIV-1 en el mundo y que en sólo un año, aproximadamente 2,7 millones de personas

contrajeron la infección. Por último, indicó que 25 millones de personas han muerto debido a la infección por HIV-1 desde el inicio de la pandemia [32].

Las relaciones sexuales representan el principal modo de transmisión

del HIV-1. Sin embargo, es poco lo que aún comprendemos acerca de los mecanismos mediante los cuales el HIV-1 logra atravesar el epitelio que reviste a la mucosa genital y rectal, a fin de infectar a sus células blanco para luego diseminarse por vía linfática y sistémica. Los

recientes ensayos clínicos de microbicidas han alertado a la comunidad científica acerca de lo mucho que no comprendemos aún en relación a los eventos tempranos involucrados en la infección por HIV-1 adquirida sexualmente y han renovado el interés sobre la investigación básica en este campo.

Las células dendríticas (CDs), junto a los macrófagos y los linfocitos T CD4, representan los blancos celulares en la infección por HIV-1. Las CDs son las células responsables de activar la respuesta inmune adaptativa mediante su capacidad, única entre las células presentadoras de antígeno profesionales, de activar linfocitos T vírgenes [17]. Las CDs inmaduras pueblan profusamente las mucosas, expresan una notable capacidad endocítica y ponen en juego mecanismos que les permiten censar el contenido luminal al emitir proyecciones (dendritas) que alcanzan el mismo. Se cree que las CDs podrían representar el primer tipo celular en tomar contacto con el HIV-1 durante la transmisión sexual del virus. De esta manera, jugarían un papel promotor en la diseminación inicial del virus, favoreciendo la infección de las células T CD4 en los órganos linfáticos secundarios [44].

En este artículo describiremos los recientes avances relativos a los mecanismos mediante los cuales se produce la transmisión del HIV-1 a través de mucosas, y centraremos nuestra atención en el papel que juegan las CDs en la transmisión y en los eventos tempranos de la infección por HIV-1.

■ TRANSMISIÓN DEL HIV-1 A TRAVÉS DE MUCOSAS: MECANISMOS PROPUESTOS

La transmisión sexual del HIV-1 es particularmente "ineficiente" al compararla con otras infecciones

transmitidas sexualmente. Estudios epidemiológicos muestran que el coito anal receptivo presenta la mayor tasa de transmisión, estimada globalmente en una de cada 100 a 1000 relaciones sexuales. El coito vaginal se asocia a una menor incidencia global, con una de cada 1000 a 10000 relaciones sexuales en la mujer, siendo el riesgo en el varón sustancialmente menor [15]. Estos datos contrastan al compararlos con otras infecciones de transmisión sexual, como por ejemplo la Hepatitis B, que presenta una tasa de transmisión global de 1 cada 5 relaciones sexuales [19]. El riesgo de infección por HIV-1 se incrementa en las etapas asociadas a viremias altas, como así también debido a la presencia concomitante de infecciones de transmisión sexual, particularmente, cuando éstas cursan con el desarrollo de lesiones ulcerativas que comprometen la integridad del epitelio [34].

¿Cómo explicar entonces el desarrollo de la epidemia por HIV-1? Si bien el HIV-1 se transmite "lentamente", logra escapar en forma asombrosamente eficaz a la respuesta inmune montada por el hospedador, produciendo una infección que presenta un largo periodo asintomático el cual puede durar varios años. Ello favorece su transmisión a otros individuos.

Pese a que la transmisión del HIV-1 a través de mucosas representa sin dudas la principal vía a través de la cual se contrae la infección, los mecanismos involucrados no han sido aún definidos. La información que disponemos actualmente proviene de estudios epidemiológicos, ensayos "in vitro", estudios realizados con explantes humanos y experiencias realizadas "in vivo" en primates. Con frecuencia, las observaciones realizadas en distintos modelos han sido contradictorias [39].

La transmisión sexual del HIV-1 contraída a través de la mucosa genital femenina puede ocurrir a través de la mucosa vaginal, exocervical y/o endocervical. La contribución relativa de cada una de estas vías no ha podido aún establecerse en forma rigurosa [23]. Estudios desarrollados en macacos histerectomizados y observaciones realizadas en mujeres con agenesia uterina y mujeres que utilizan diafragma como método anticonceptivo, sugieren que la transmisión suele ocurrir a través de la mucosa vaginal [21, 26].

La mucosa vaginal y también la del exocervix se encuentran recubiertas por un epitelio estratificado que no es susceptible a la infección por HIV-1 [27]. El bajo pH y la presencia de peróxido de hidrógeno y proteasas en las superficies mucosas parecen proveer un importante nivel de protección antimicrobiana [22]. En otras palabras, la integridad de las mucosas propias a la vagina y al ectocervix, provee una formidable protección a la infección por HIV-1. No obstante, con frecuencia, esta integridad se encuentra comprometida. Numerosos procesos infecciosos ocasionan lesiones ulcerativas en la mucosa genital. Por otra parte, las propias relaciones sexuales consentidas han mostrado asociarse en un 60% de los casos a la inducción de microabrasiones en la mucosa genital femenina [31]. Estudios epidemiológicos han comprobado que la presencia de microabrasiones en el epitelio incrementa notoriamente el riesgo de transmisión del HIV-1 [39]. En presencia de estas microabrasiones, el HIV-1 podría acceder fácilmente a la submucosa, donde abundan macrófagos, linfocitos T CD4 y CDs, blancos preferidos de la infección por HIV-1. Por otra parte, sin alcanzar la submucosa, el HIV podría interactuar eficazmente con las CDs. En primer lugar, con las células de Langerhans, CDs inmaduras que pueblan el interior del epitelio

estratificado vaginal. Por último, el HIV-1 podría acceder a las propias células de Langerhans, como también a las CDs presentes en el subepitelio, interactuando con proyecciones de las CDs que alcanzan el lumen, aprovechándose de este mecanismo que normalmente permite a las CDs censar directamente el contenido microbiano intraluminal [10, 11, 8, 30].

La mucosa del endocervix, a diferencia de la mucosa vaginal, se encuentra recubierta por un epitelio columnar simple. Estas células son también resistentes a la infección por HIV-1. En condiciones normales, la mucosa del endocervix se encuentra dentro del canal cervical, protegida por un tapón mucoso que actúa como barrera física y contiene, además, sustancias con actividad antiviral [1, 28]. La extensión del epitelio columnar por fuera del endocervix (ectropion), parecería facilitar la transmisión sexual del HIV [9].

Por otra parte, la mucosa rectal se encuentra recubierta por un epitelio simple y, a diferencia de lo observado en la mucosa genital, se encuentra poblada por gran cantidad de linfocitos T CD4 y CDs que integran el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. En el epitelio intestinal encontramos, además, células "M", capaces de endocitar partículas virales desde la luz intestinal hacia la lámina propia [2]. La menor protección ejercida por un epitelio simple y la abundancia de células blanco en el subepitelio parecería explicar la mayor susceptibilidad de la mucosa rectal a la transmisión de HIV-1.

En relación al tracto genital masculino, el sitio que presentaría un mayor compromiso en la transmisión sexual del HIV-1 sería la mucosa propia a la cara interna del pre-

pucio. Consistente con esta presunción, se ha demostrado que la circuncisión reduce significativamente el riesgo de adquirir la infección por HIV-1 [8]. Un segundo sitio permisivo a la transmisión del HIV-1 sería la mucosa asociada al orificio uretral, subyacente a la cual se concentran células blanco del HIV-1 [18].

■ IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA TRANSMISIÓN SEXUAL DEL HIV

1. Las células dendríticas

En el año 1973, trabajando en la Universidad de Rockefeller, en los Estados Unidos, Ralph Steinman (por ese entonces becario posdoctoral) y Zanvil Cohn (un investigador de destacada trayectoria en el estudio de la funcionalidad de los macrófagos) realizaron una asombrosa observación. Al analizar la identidad de los diferentes tipos celulares presentes en una suspensión de células provenientes de un ganglio linfático disgregado, obtenido de un ratón sano, encontraron que contenía no sólo linfocitos y macrófagos, sino un tercer tipo celular que representa el 1% del total de las células del ganglio. Esta pequeña población fue caracterizada por su forma "estrellada" y su escasa actividad endocítica. Ambas propiedades permitieron distinguirla claramente de los macrófagos.

Esta observación condujo a la publicación de un artículo científico bajo el título "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice" (Journal of Experimental Medicine 137:1142-1162, 1973) y permitió uno de los avances conceptuales más importantes en la historia de la inmunología. El resumen del artículo finaliza con la siguiente frase: "*The term 'dendritic cell' is proposed for this novel cell type*".

Las CDs, son células pertenecientes a la inmunidad innata, que representan el "motor" y "cerebro" de la inmunidad adaptativa. Son las responsables de "poner en marcha" la inmunidad adaptativa, ya que son las únicas capaces de activar linfocitos T vírgenes inmunocompetentes (*naive*). No sólo los activan sino que también orientarán el curso de la inmunidad adaptativa, merced a su capacidad de liberar diferentes familias de citoquinas que inducirán la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en diferentes perfiles: Th1, Th2, Th17, Treg. Cada uno de estos perfiles pondrá en juego diferentes mecanismos inmunes. Las células Th1 promoverán la activación del macrófago. Las células Th2 promoverán la producción, movilización y activación de eosinófilos, la producción de anticuerpos IgE y la activación de los mastocitos. Las células Th17 colaborarán con los linfocitos B, permitiéndoles su posterior diferenciación en plasmocitos productores de anticuerpos. Las células Th17 promoverán la producción, movilización y activación de neutrófilos, mientras que las células Treg mediarán la supresión de los diferentes mecanismos efectores propios de la inmunidad adaptativa.

Las CDs son las únicas células presentadoras de antígenos capaces de poner en marcha la respuesta inmune adaptativa, mediante la activación de linfocitos T vírgenes en los ganglios linfáticos. Las CDs median esta actividad gracias a que expresan una notoria capacidad para capturar, endocitar y procesar antígenos, migrar a los ganglios drenantes del sitio infeccioso y expresar altos niveles de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y de moléculas de clases I y II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) [17]. Es importante enfatizar que las CDs no sólo son capaces de poner en marcha la inmunidad adaptativa,

sino también de silenciarla, induciendo la tolerización de linfocitos T autorreactivos en tejidos periféricos [40]. La actividad inmunoestimuladora o tolerógena de las CDs se expresa fundamentalmente en los órganos linfáticos secundarios pero depende, en última instancia, de lo percibido por las CDs en la periferia, percepción que está mediada a través un complejo sistema de receptores que integra, en primer lugar, a los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) y a los receptores de citoquinas y quimiocinas.

Las CDs son generadas a partir de precursores presentes en la médula ósea que aún no han sido rigurosamente caracterizados. No obstante, los monocitos parecen representar, mayoritariamente, sus precursores inmediatos. Los precursores circulantes de las CDs se extravasan en tejidos periféricos, fundamentalmente en piel y mucosas, diferenciándose a CDs inmaduras. Las CDs inmaduras poseen una gran capacidad para detectar, capturar y procesar antígenos y microorganismos, pero expresan una pobre capacidad para activar linfocitos T vírgenes. La detección de productos microbianos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs), citoquinas proinflamatorias y señales indicativas de estrés o daño tisular (alarminas o patrones moleculares asociados a daño –DAMPs–), a través de los RRP, suele conducir a la activación de las CDs. Al activarse, las CDs inmaduras experimentan un conjunto notable de cambios: a) disminuyen la expresión de E-cadherina, molécula de adhesión que media su interacción con queratinocitos en la piel y células epiteliales en las mucosas, permitiendo de este modo a las CDs liberarse de “ataduras” que las mantienen en la periferia; b) aumentan la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, lo que permite a las CDs censar la presencia

de las quimiocinas CCL19 y CCL21, producidas en los vasos y ganglios linfáticos, y migrar hacia los mismos siguiendo un gradiente creciente de concentración de estas dos quimiocinas (quimiotaxis); c) disminuyen dramáticamente su capacidad de endocitar antígenos y procesarlos, asegurando de este modo que las CDs sólo puedan presentar a los linfocitos T vírgenes, en los ganglios linfáticos, antígenos endocitados en la periferia; d) incrementan notoriamente la expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas de clase I y II del CMH, de modo de poder activar a los linfocitos T vírgenes en el área paracortical de los ganglios linfáticos [37].

2. Las células dendríticas jugarían un papel crítico en los eventos tempranos de la transmisión sexual del HIV-1

Las CDs inmaduras presentes en las mucosas representan una población heterogénea integrada por diferentes subpoblaciones que se distinguen por su ubicación, fenotipo y funcionalidad. Todas ellas expresan CD4 y cantidades variables de los receptores CXCR4 y CCR5, siendo por lo tanto potenciales blancos de la infección por HIV-1. No obstante, una vez infectadas, las CDs producen cantidades de virus notoriamente inferiores a las producidas por los macrófagos y los linfocitos T activados [44].

Las CDs parecen representar la primera célula blanco en tomar contacto con el HIV-1. Luego de la inoculación vaginal a macacos con el virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV), las CDs son el tipo celular predominante que se infecta durante la fase temprana de la infección. Por otra parte, estudios realizados en biopsias de mucosa rectal provenientes de individuos infectados mostraron que las CDs unen el 90%

del virus asociado a mucosa, pese a que ellas representan sólo el 5% del total de células mononucleares presentes en la mucosa rectal. Numerosas líneas de evidencia apoyan la noción de que el HIV-1 subvierte la función de las CDs. Al mismo tiempo que median la puesta en marcha de la respuesta inmune adaptativa contra HIV-1, las CDs median la transmisión del virus a los linfocitos T CD4⁺ en los tejidos linfáticos contribuyendo a la diseminación de la infección [44].

La transmisión del HIV-1 desde las CDs al linfocito T CD4⁺ activado involucra una serie de etapas y una participación decisiva de la molécula DC-SIGN. DC-SIGN es un receptor de reconocimiento de patrones perteneciente a la familia de lectinas tipo C. Es una proteína transmembrana que se expresa en CDs presentes en la dermis y en las mucosas de vagina, cérvix, placenta, recto, intestino y pulmones [20, 42]. También se la ha encontrado en CDs presentes en los ganglios linfáticos. Como ocurre con la mayoría de las lectinas tipo C, la expresión de DC-SIGN es alta en CDs inmaduras y disminuye considerablemente luego de su maduración [35]. DC-SIGN también es expresado por linfocitos B y subpoblaciones de macrófagos [14].

La interacción de la gp120 del HIV con DC-SIGN conduce a la endocitosis del virus, permitiendo de esta manera, la posterior degradación de sus componentes en el compartimento endosomal, y el consecuente cargado de péptidos antigénicos en moléculas de clase II del CMH. Sin embargo, una fracción del virus endocitado no es vehiculizado a compartimentos degradativos. Por el contrario, permanece en un compartimento no degradativo, preservando de este modo su capacidad infecciosa, mientras las CDs migran

desde el sitio de infección en la mucosa hacia los ganglios drenantes. El HIV-1, como partícula intacta e infectante, es transportado entonces por las CDs como virus intracelular, desde la periferia hacia área paracortical del ganglio drenante. Las CDs, ya como CDs maduras, presentarán sobre su superficie péptidos inmunogénicos provenientes de la degradación de proteínas virales, en sus moléculas de clase II del CMH, induciendo la activación de células T CD4⁺ específicas hacia antígenos del HIV-1. La activación de la célula T CD4⁺ la tornará susceptible a la infección por HIV-1 [41]. Es entonces cuando las CDs reciclan a su superficie el HIV-1 endocitado en la periferia, ofertándolo a la célula T CD4⁺, que se ha tornado susceptible a la infección. Este mecanismo de facilitación mediado por las CDs ha mostrado potenciar notablemente la capacidad del HIV-1 de infectar linfocitos T CD4⁺, particularmente cuando la concentración de partículas virales en el entorno del linfocito T CD4⁺ es baja, reflejando lo que realmente ocurriría *in vivo* [13]. Por otra parte, este mecanismo facilitaría el traslado del virus desde la mucosa hasta los ganglios linfáticos regionales, sin riesgo de ser destruido por los elementos efectores de la inmunidad innata. En otras palabras, el HIV-1 utilizaría a las CDs como "caballos de Troya" de la infección [42].

■ EL SEMEN, MUCHO MÁS QUE UN VECTOR EN LA TRANSMISIÓN SEXUAL DEL HIV-1: MODULACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y EL HIV-1

Siendo el semen el principal vector en la transmisión sexual del HIV-1, llama la atención que haya sido considerado clásicamente un mero reservorio del HIV-1 y que no se haya examinado en forma rigurosa si, más allá de vehiculizar el virus,

el semen podría ejercer efectos moduladores en el inicio del proceso infeccioso.

El semen es un fluido biológico muy complejo. El plasma seminal contiene una gran diversidad de componentes incluyendo lípidos, carbohidratos, numerosos péptidos y proteínas. Contiene también una gran variedad de citoquinas y quimiocinas. Estos componentes son secretados por diferentes órganos: el testículo, el epidídimo y la próstata, fundamentalmente [33]. La concentración de proteínas en el plasma seminal varía normalmente entre 35 a 55 mg/ml, y estudios de proteómica han revelado la existencia de más de 900 proteínas diferentes en el plasma seminal [12].

El HIV-1 se encuentra en el semen en forma de partículas virales libres o en linfocitos infectados. Se ha sugerido que ambas formas contribuyen a la transmisión del HIV-1, pero se desconoce la contribución relativa de cada una [43]. Un tercer reservorio de HIV-1 en el semen es representado por los espermatozoides. Sin embargo, el papel de los espermatozoides ha sido un tema de debate [25] a pesar de que se ha demostrado la presencia de partículas virales y/o de ácidos nucleicos virales en los espermatozoides de hombres infectados mediante una variedad de técnicas [3].

Recientemente, en nuestro laboratorio hemos analizado la interacción del HIV-1 con el espermatozoide y su capacidad para transmitir el virus a CDs inmaduras, y encontramos que la infectividad del HIV-1 se observa potenciada al encontrarse el virus asociado al espermatozoide. Por otra parte, demostramos que el espermatozoide transfiere eficientemente el HIV-1 a las CDs a través de un proceso que requiere del contacto físico entre el espermatozoide

y la CDs. Observamos además, que la interacción del espermatozoide con la CDs modula la secreción de citoquinas por parte de las CDs, favoreciendo la generación de un perfil tolerogénico. De esta forma la asociación del HIV-1 a los espermatozoides podría no sólo contribuir a la transmisión sexual del HIV-1, sino también condicionar la respuesta inmune en las etapas tempranas del proceso infeccioso [7].

¿Cómo podría el espermatozoide tomar contacto con las CDs en la mucosa del tracto genital femenino? Podríamos plantear dos escenarios posibles: a través de pequeñas abrasiones o lesiones en la mucosa, inducidas principalmente durante el acto sexual o a través de lesiones ulcerativas provocadas por infecciones activas en el tracto genital producidas por patógenos, tales como el virus del herpes simple [31]. Por otra parte, la interacción del espermatozoide con las CDs podría involucrar un tercer mecanismo: el espermatozoide interactuaría con las proyecciones de las CDs denominadas dendritas que alcanzan el lumen de los tractos genital y rectal [39]. Estos mecanismos se muestran en la Figura 1.

Estos resultados contradicen la idea que sostiene para el semen un mero papel pasivo en la transmisión sexual del HIV-1. En este mismo sentido, estudios previos señalan que el plasma seminal pondría en marcha mecanismos que facilitarían la transmisión sexual del HIV-1: a) al neutralizar el pH vaginal, previniendo la inactivación del HIV-1 observada a pH 5.0, valor normal del pH vaginal [6], b) al aportar componentes del complemento, capaces de opsonizar (recubrir) al HIV-1, favoreciendo de este modo su interacción con diferentes tipos celulares [5], c) al inducir la generación de una respuesta inflamatoria local en la

mucosa receptiva, asociada a la infiltración de leucocitos y células de Langerhans, potenciales blancos en la infección por HIV-1 [4, 38]. Recientemente, Munch y colaboradores describieron, en plasma seminal, la presencia de péptidos catiónicos que, asociándose en forma de fibras, potencian la infectividad del HIV-1 [29]. Por el contrario, Martellini y colaboradores han mostrado que péptidos catiónicos presentes en el plasma seminal inhiben la infección de células TCD4+ *in vitro* [24]. Estas discrepancias no son sencillas de explicar. Podrían reflejar diferencias en los modelos experimentales empleados. En el mismo campo de investigación, nuestro grupo ha demostrado que el plasma seminal contiene

un novedoso ligando de DC-SIGN, la glicoproteína clusterina, capaz de unirse a DC-SIGN con alta afinidad, inhibiendo de esta manera tanto la infección de las CDs como su capacidad de transmitir el HIV-1 a linfocitos T CD4+ [36]. A través de este mecanismo, el semen podría mediar un efecto protector en relación a la transmisión sexual del HIV-1.

■ CONCLUSIÓN

Las relaciones sexuales no protegidas representan la vía más importante en la transmisión del HIV-1 y el semen representa su principal vector. A pesar de los importantes esfuerzos realizados a fin de entender los mecanismos a través de los

cuales el HIV-1 atraviesa la mucosa y establece la infección, nuestro conocimiento en este campo es aún rudimentario. Las evidencias mencionadas en la presente revisión sugieren fuertemente que las CDs residentes en las mucosas jugarían un papel promotor en la transmisión sexual del HIV-1. Al subvertir la funcionalidad de las CDs el virus promovería su propia transmisión a los linfocitos T CD4+, condicionando además la capacidad de las CDs de montar una respuesta inmune adaptativa protectora y eficiente.

■ REFERENCIAS:

1. Agace, W.W., Amara, A., Roberts, A. L., Pablos, J. L., Thelen, S., Ugucchio-

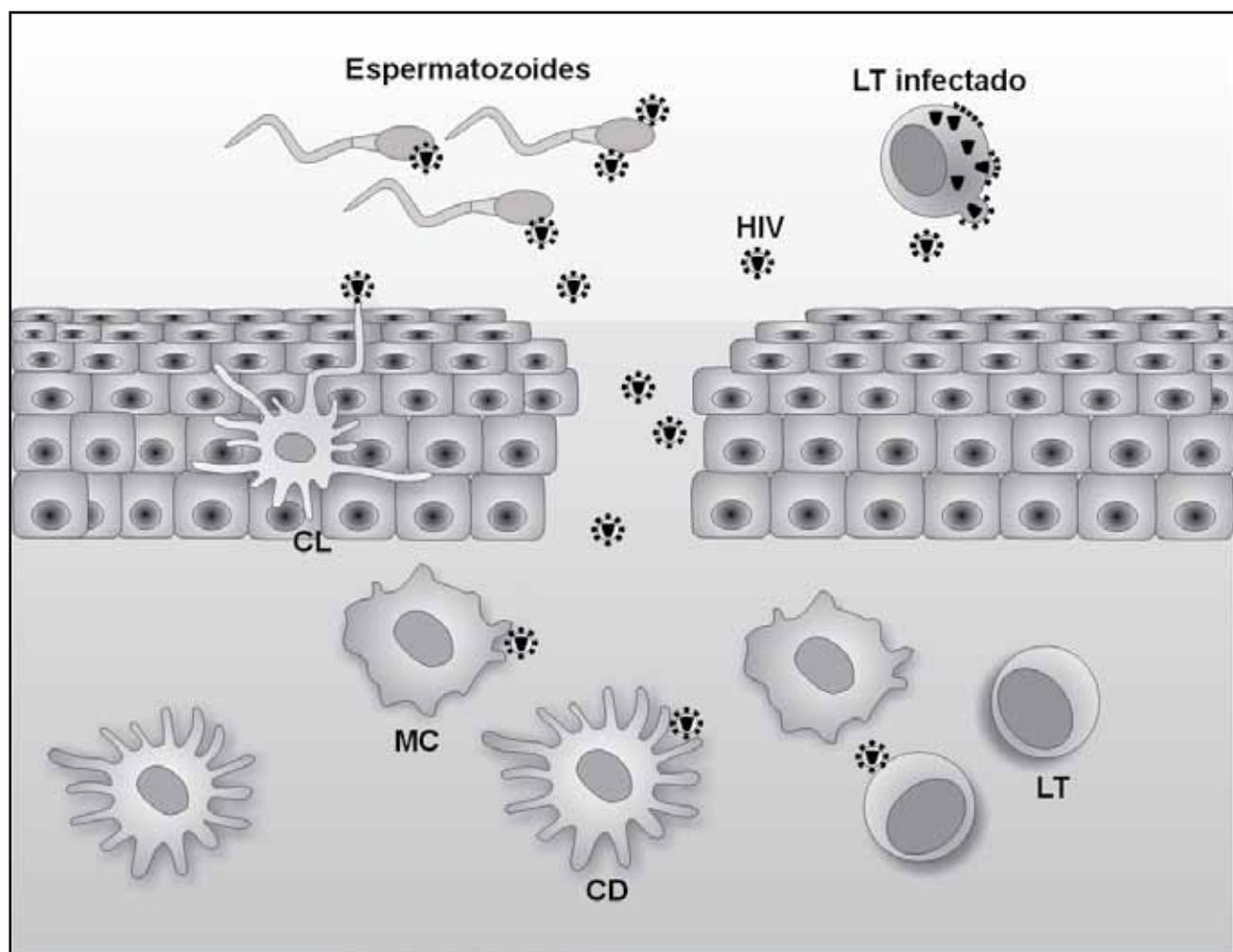


Figura 1: Esquema de la transmisión de HIV a través de la mucosa vaginal. Mediante el pasaje a través de abrasiones generadas durante el contacto sexual el virus logra acceder a las células blanco de la infección (CL: Célula de Langerhans, MC: macrófago, CD: célula dendrítica, LT: linfocito T CD4+).

- ni, M., Li, X. Y. et al. (2000) Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Current Biology*. 10: 325-8.
2. Amerongen, H.M., Weltzin, R., Farnet, C. M., Michetti, P., Haseltine, W. A., Neutra, M. R. (1991) Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *Journal of Acquire Immune Deficiency Syndromes*. 4: 760-5.
 3. Baccetti, B., Benedetto, A., Burrini, A. G., Collodel, G., Elia, C., Piomboni, P. (1991) HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*. 23: 339-45.
 4. Berlier, W., Cremel, M., Hamzeh, H., Levy, R., Lucht, F., Bourlet, T., et al. (2006) Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Human Reproduction*. 21: 1135-42.
 5. Bouhlal, H., Chomont, N., Haefner-Cavaillon, N., Kazatchkine, M. D., Belec, L., Hocini, H. (2002) Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. *Journal of Immunology*. 169: 3301-6.
 6. Bouvet, J.P., G. Gresenguet, L. Belec. (1997) Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clinical Microbiology and Infectology*. 3: 19-23.
 7. Ceballos, A., Remes Lenicov, F., Sabatte, J., Rodríguez Rodríguez, C., Cabrini, M., Jancic, C. et al. (2009) Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 206: 2717-33.
 8. Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y., Germain, R. N. (2006) Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *Journal of Experimental Medicine*. 203: 2841-52.
 9. Coombs, R.W., P.S. Reichelderfer, A.L. Landay. (2003) Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *Aids*. 17: 455-80.
 10. de Jong, M.A. and T.B. Geijtenbeek. (2009) Human immunodeficiency virus-1 acquisition in genital mucosa: Langerhans cells as key-players. *Journal of Internal Medicine*. 265: 18-28.
 11. de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M. A., de Gruijl, T., et al. (2007) Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature Medicine*. 13: 367-71.
 12. Fung, K.Y., Glode, L. M., Green, S., Duncan, M. W. (2004) A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate*. 61: 171-81.
 13. Geijtenbeek, T.B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., et al. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 100: 587-97.
 14. Granelli-Piperno, A., Pritsker, A., Pack, M., Shimeliovich, I., Arrighi, J. F., Park, C. G., et al. (2005) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *Journal of Immunology*. 175: 4265-73.
 15. Gray, R.H., Wawer, M. J., Brookmeyer, R., Sewankambo, N. K., Serwadda, D., Wabwire-Mangen, F., et al. (2001) Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 357: 1149-53.
 16. Gray, R.H., Kigozi, G., Serwadda, D., Makumbi, F., Watya, S., Nalugoda, F., et al. (2007) Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet*. 369: 657-66.
 17. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., Amigorena, S. (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Reviews of Immunology*. 20: 621-67.
 18. Hussain, L.A., T. Lehner. (1995) Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology*. 85: 475-84.
 19. Judson, F.N. (1981) Epidemiology of sexually transmitted hepatitis B infections in heterosexuals: a review. *Sexual Transmitted Diseases*. 8(suppl 4): 336-43.
 20. Kammerer, U., Eggert, A. O., Kapp, M., McLellan, A. D., Geijtenbeek, T. B., Dietl, J., et al. (2003) Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *American Journal of Pathology*. 162: 887-96.
 21. Kell, P.D., Barton, S. E., Edmonds, D. K., Boag, F. C. (1992) HIV infection in a patient with Meyer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 85: 706-7.

22. Klebanoff, S.J., R.W. Coombs. (1991) Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *Journal of Experimental Medicine*. 174: 289-92.
23. Lederman, M.M., R.E. Offord, O. Hartley. (2006) Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nature Reviews Immunology*. 6: 371-82.
24. Martellini, J.A., Cole, A. L., Venkataraman, N., Quinn, G. A., Svoboda, P., Gangrade, B. K., et al. (2009) Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *Faseb Journal*. 23: 3609-18.
25. Mermin, J.H., Holodniy, M., Katzstein, D. A., Merigan, T. C. (1991) Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*. 164: 769-72.
26. Miller, C.J., Alexander, N. J., Vogel, P., Anderson, J., Marx, P. A. (1992) Mechanism of genital transmission of SIV: a hypothesis based on transmission studies and the location of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques. *Journal of Medical Primatology*. 21: 64-8.
27. Miller, C.J., R.J. Shattock. (2003) Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes and Infection*. 5: 59-67.
28. Moriyama, A., Shimoya, K., Ogata, I., Kimura, T., Nakamura, T., Wada, H., et al. (1999) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*. 5: 656-61.
29. Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., et al. (2007) Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell*. 131: 1059-71.
30. Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., et al. (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 307: 254-8.
31. Norvell, M.K., Benrubi G.I., Thompson R.J. (1984) Investigation of microtrauma after sexual intercourse. *Journal of Reproductive Medicine*. 29: 269-71.
32. ONUSIDA, U. (2008) Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008.
33. Owen, D.H., D.F. Katz. (2005) A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology*. 26: 459-69.
34. Quinn, T.C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., et al. (2000) Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *New England Journal of Medicine*. 342: 921-9.
35. Relloso, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Rodriguez-Fernandez, J. L., de la Rosa, G., Longo, N., et al. (2002) DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *Journal of Immunology*. 168: 2634-43.
36. Sabatte, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., et al. (2007) Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *Journal of Virology*. 81: 13723-34.
37. Sabatte, J., Maggini, J., Nahmod, K., Amaral, M. M., Martinez, D., Salamone, G., et al. (2007) Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 18: 5-17.
38. Sharkey, D.J., Macpherson, A. M., Tremellen, K. P., Robertson, S. A. (2007) Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular Human Reproduction*. 13: 491-501.
39. Shattock, R.J., J.P. Moore. (2003) Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*. 1: 25-34.
40. Steinman, R.M., D. Hawiger, M.C. Nussenzweig. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annual Reviews Immunology*. 21: 685-711.
41. Strelbel, K., J. Luban, K.T. Jeang. (2009) Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Medicine*. 7: 48.
42. van Kooyk, Y., T.B. Geijtenbeek. (2003) DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 3: 697-709.
43. Vernazza, P.L. (2005) HIV in semen: still more to be learned. *AIDS Research and Therapy*. 2: 11.
44. Wu, L., V.N. KewalRamani. (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology*. 6: 859-68.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Revista CIENCIA E INVESTIGACION

Ciencia e Investigación, órgano de difusión de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC), es una revista de divulgación científica y tecnológica destinada a educadores, estudiantes universitarios, profesionales y público en general. La temática abarcada por sus artículos es amplia y va desde temas básicos hasta bibliográficos: actividades desarrolladas por científicos y tecnólogos, entrevistas, historia de las ciencias, crónicas de actualidad, biografías, obituarios y comentarios bibliográficos. Desde el año 2009 la revista tiene difusión en versión on line (www.aargentinapciencias.org)

PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO

El artículo podrá presentarse vía correo electrónico, como documento adjunto, escrito con procesador de texto word (extensión «doc») en castellano, en hoja tamaño A4, a doble espacio, con márgenes de por lo menos 2,5 cm. en cada lado, letra Time New Roman tamaño 12. Las páginas deben numerarse (arriba a la derecha) en forma corrida, incluyendo el texto, glosario, bibliografía y las leyendas de las figuras. Colocar las ilustraciones (figuras y tablas) al final en página sin numerar. Por tratarse de artículos de divulgación científica aconsejamos acompañar el trabajo con un glosario de los términos que puedan resultar desconocidos para los lectores no especialistas en el tema.

La primera página deberá contener: Título del trabajo, nombre de los autores, institución a la que pertenecen y lugar de trabajo, correo electrónico de uno solo de los autores (con asterisco en el nombre del autor a quién pertenece), al menos 3 palabras claves en castellano y su correspondiente traducción en inglés. La segunda página incluirá un resumen o referencia sobre el trabajo, en castellano y en inglés, con un máximo de 250 palabras para cada idioma. El texto del trabajo comenzará en la tercera página y finalizará con el posible glosario, la bibliografía y las leyendas de las figuras. La extensión de los artículos que traten temas básicos no excederá las 10.000 palabras, (incluyendo título, autores, resumen, glosario, bibliografía y leyendas). Otros artículos relacionados con actividades científicas, bibliografías, historia de la ciencia, crónicas o notas de actualidad, etc. no deberán excederse de 6.000 palabras.

El material gráfico se presentará como: a) figuras (dibujos e imágenes en formato JPG) y se numerarán correlativamente (Ej. Figura 1) y b) tablas numeradas en forma correlativa independiente de las figuras (Ej. Tabla 1). En el caso de las ilustraciones que no sean originales, éstas deberán citarse en la leyenda correspondiente (cita bibliográfica o de página web). En el texto del trabajo se indicará el lugar donde el autor ubica cada figura y cada tabla (poniendo en la parte media de un renglón Figura... o Tabla..., en negrita y tamaño de letra 14). Es importante que las figuras y cualquier tipo de ilustración sean de buena calidad. La lista de trabajos citados en el texto o lecturas recomendadas, deberá ordenarse alfabéticamente de acuerdo con el apellido del primer autor, seguido por las iniciales de los nombres, año de publicación entre paréntesis, título completo de la misma, título completo de la revista o libro donde fue publicado, volumen y página. Ej. Benin L.W., Hurste J.A., Eigenel P. (2008) The non Lineal Hypercycle. Nature 277, 108 – 115.

Se deberá acompañar con una carta dirigida al Director del Comité Editorial de la revista Ciencia e Investigación solicitando su posible publicación (conteniendo correo electrónico y teléfono) y remitirse a cualquiera de los siguientes miembros del Colegiado Directivo de la AAPC: abaldi@dna.uba.ar - nidiabasso@yahoo.com - miguelblesa@yahoo.es – xammar@argentina.com - sarce@cnea.gov.ar y con copia a secretaria@aargentinapciencias.org

Quienes recepcionen el trabajo acusarán recibo del mismo y lo elevarán al Comité Editorial. Todos los artículos serán arbitrados. Una vez aprobados para su publicación, la versión corregida (con las críticas y sugerencias de los árbitros) deberá ser nuevamente enviada por los autores.

PREMIO / AWARD / PRÊMIO INTERCIENCIA - 2012

El Gobierno de Canadá, en colaboración con la Asociación francophone pour le Savoir, en su calidad de miembro de la Asociación Interciencia, establecieron una Fundación Interciencia con la finalidad de auspiciar el otorgamiento de un Premio Anual para reconocer a un individuo que haya hecho una contribución sobresaliente para el avance en los países de las Américas de una disciplina de las ciencias y la ingeniería.

Para el PREMIO INTERCIENCIA 2012, el Comité Ejecutivo de la Asociación Interciencia, ha seleccionado el campo de CIENCIAS DE LA VIDA. El jurado designado evaluará la calidad científica del trabajo de los candidatos, su repercusión en el campo respectivo y su impacto en la región. El PREMIO será otorgado en la Reunión Anual de la Asociación y consistirá de USD 5.000, una Placa Conmemorativa y una suma razonable para cubrir los gastos de viaje para asistir a la reunión.

ELEGIBILIDAD

EL PREMIO está abierto a los científicos e ingenieros nacionales o residentes legales en los países de las Américas. Cualquier individuo en la comunidad científica e ingeniería que haya hecho contribución sustancial en ciencias de la vida es elegible para este premio.

PROCEDIMIENTO DE POSTULACIÓN

Todas las Asociaciones miembros de la Asociación Interciencia podrán proponer hasta tres candidatos, incluyendo los siguientes datos:

- Nombre del postulante, dirección y teléfono.
- Nombre y el título del candidato, su afiliación institucional y dirección.
- Un resumen de acciones que forma la base de postulación (máximo 250 palabras).
- Un escrito más largo, que no exceda a tres páginas, que provea detalles adicionales para la nominación.
- Dos cartas de apoyo.
- Un Curriculum vitae (máximo 3 páginas) con las posiciones profesionales desempeñadas.
- Cualquier otra documentación (artículos y otros materiales ligeros) que ilustre el significado de los logros del candidato postulado.
- Todo el material será propiedad de la Asociación Interciencia.
- La postulación y el material (en caso de libros y otro material impreso, enviar solo la referencia o un resumen) debe ser enviado por correo electrónico a:

mahabirgupta@gmail.com
cc: **michel.bergeron@umontreal.ca**

FECHA LÍMITE DE POSTULACIÓN

Todo el material deberá recibirse en Panamá antes del 30 de julio de 2012.

The Government of Canada, in collaboration with the Association francophone pour le Savoir, as a member of the Interciencia Association, have established an Interciencia Foundation with the aim of patronizing an Annual Award to recognize an individual that has made an outstanding contribution to the advancement, in the Americas, of a field of science and engineering.

For the INTERCIENCIA AWARD 2012, the Executive Council of the Interciencia Association has chosen the field of LIFE SCIENCES. The designated jury will evaluate the scientific quality of the candidates' work, and its impact on the fields and in the region. The AWARD will be bestowed at the Annual Meeting of the Association and will consist of US\$ 5,000, a Commemorative Plate and sufficient funds to attend the meeting.

ELEGIBILITY

Eligibility The AWARD is open to scientists and engineers who are nationals or legal residents of countries of the Americas. Any individual in the scientific and engineering communities that has made a substantial contribution in life sciences is eligible for this award.

NOMINATION PROCEDURE

All Member Associations of the Interciencia Association may nominate up to three candidates, including the following data:

- Nominator's name, address and telephone number.
- Candidate's name and title, institutional affiliation and address.
- A summary of facts that constitute the basis for the nomination (up to 250 words).
- A longer statement, not to exceed 3 pages, providing additional details.
- Two letters of support.
- A Curriculum vitae (maximum 3 pages) with professional position held.
- Any other documents (articles or other light materials) that illustrate the significance of the nominee's achievements.
- All the material will be the property of the Interciencia Association.
- Nomination and materials (in case of books and other printed material only references and summaries) should be send via e-mail to:

mahabirgupta@gmail.com
cc: **michel.bergeron@umontreal.ca**

NOMINATION DEADLINE

All the material submitted should be received in Panama prior to July 30, 2012.

O Governo do Canadá, em colaboração com a Associação francophone pour le Savoir, na sua qualidade de membro da Associação Interciência, criou uma Fundação Interciência com a finalidade de auspiciar o outorgamento de um Prêmio Anual para reconhecer a um indivíduo que tenha feito uma contribuição sobresaliente para o avanço nos países das Américas de uma disciplina das ciências e a engenharia.

Para o PRÊMIO INTERCIÊNCIA 2012, o Comitê Executivo da Associação Interciência, tem selecionado o campo da CIÊNCIAS DA VIDA. O júri designado avaliará a qualidade científica do trabalho dos candidatos, sua repercussão no campo respectivo e seu impacto na região. O PRÊMIO será outorgado na Reunião Anual da Associação e consistirá de USD 5.000, uma Placa Comemorativa e uma soma razoável para cobrir os gastos de viagem para assistir à reunião.

ELEGIBILIDADE

O PRÊMIO está aberto aos cientistas e engenheiros nacionais ou residentes legais nos países das Américas. Qualquer indivíduo na comunidade científica e engenharia que tenha feito contribuição substancial nas ciências da vida é elegível para este prêmio.

PROCEDIMENTO DE POSTULAÇÃO

Todas as Associações membros da Associação Interciência poderão propor até três candidatos, incluindo os seguintes dados:

- Nome do postulante, endereço e telefone.
- Nome e o título do candidato, sua afiliação institucional e endereço.
- Um resumo de ações que forme a base da postulação (máximo 250 palavras).
- Um escrito mais longo, que não exceda três páginas, que provea detalhes adicionais para a nominación.
- Duas cartas de apoio.
- Um Curriculum vitae (máximo 3 páginas) com as posições profissionais desempenhadas.
- Qualquer outra documentação (artigos ou outros materiais ligeiros) que ilustre o significado das conquistas do candidato postulado.
- Todo o material será de propriedade de Associação Interciência.
- A postulação e o material (em caso de livros e outro material impreso, enviar solo a referencia ou um resumo) deve ser enviado por correio electrónico a:

mahabirgupta@gmail.com
cc: **michel.bergeron@umontreal.ca**

DATA LÍMITE DE POSTULAÇÃO

Todo o material deverá receberse no Panamá antes do 30 de julho de 2012.

Dirección / Address / Endereço:

ASOCIACIÓN INTERCIENCIA
c/o APANAC
Apartado 0824 00172
Panamá
República de Panamá

Teléfono: (507) 523 - 6311
Fax: (507) 264 - 0789

Mayor información / More information / Major informação mahabirgupta@gmail.com cc: michel.bergeron@umontreal.ca

El artículo 41 de la Constitución Nacional expresa:

Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano, y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes, sin comprometer las de las generaciones futuras.

Para ello, trabajamos en el Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (3iA) en docencia, investigación y desarrollo tecnológico.

3iA



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL
www.unsam.edu.ar

¡¡Oferta!!
Pipetas y
Artículos
Plásticos

buenaconexión publicidades



ThermoForma

ThermoLabsystems



Nikon



ThermoSorvall



ThermoSorvall



Para encontrar todas las soluciones
en instrumental, no hace falta investigar.

 **microlat**
instrumental científico

Carlos Pellegrini 755 - Pto 9 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Tel/Fax: 4326 5205 - 4322 6341 - www.microlat.com.ar



Thermo

TMC



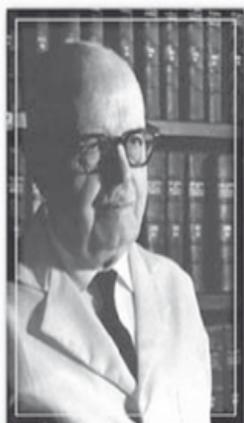
FOTODYNE

conviron

HITACHI



Molecular Devices



Dr. Bernardo A. Houssay

Instituto de Biología y Medicina Experimental

IBYME

El Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), asociado al CONICET, fue fundado por el Dr. Bernardo A. Houssay en 1944. Su misión es impulsar el conocimiento en diversas áreas como: oncología, endocrinología, reproducción, neurociencias, comportamiento, inmunopatología y biotecnología. Todo ello está orientado a ampliar el conocimiento de los principios fundamentales que rigen el funcionamiento de los seres vivos y desarrollar aplicaciones tecnológicas en el área de la biomedicina.

IByME - CONICET - Vuelta de Obligado 2490 - Buenos Aires - Argentina / Tel: 54-11-47832869