



# Bitácora digital

REVISTA ELECTRÓNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS (UNC)

# Vacunas e inmunidad



Secretaría de  
Ciencia y Tecnología



FCQ  
Facultad de  
Ciencias Químicas



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

## Índice

# VACUNAS e INMUNIDAD

## Trabajos de Especialización

*“Primera Etapa en el desarrollo de un ELISA competitivo para la determinación de la proteína FABP-I aplicado a pacientes celíacos”*, por Clarisa Pascual, Julián Belgamo, Betina Córscico, Silvia G. Correa.

*“Absceso hepático y bacteriemia por *Schaalia Odontolytica* en un paciente inmunocomprometido”*, por María Eugenia Valenti, Liliana Mobilia, Mariana Boleas, Gabriela Alcázar, Ana Prestifilippo, Milagros Piedrabuena, Maillen Calgaro.

## Trabajo

*“Nanoplateformas sintéticas, Bio-conjugadas e inmunológicas para diagnóstico y desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades infecciosas”*, por Luna R. Gomez Palacios, Sofia Martinez, Cecilia Tettamanti, Daniela Quinteros, Guillermo Bracamonte.

## Artículo de Revisión

*“Degeneración Macular Asociada a la Edad: importancia del uso de modelos animales para el estudio de su patogénesis y potenciales agentes terapéuticos”*, por Albana Tovo, Daniela I. Costantini, Paula V. Subirada, Pablo F. Barcelona.

## Artículo de Divulgación

*“Nuevas estrategias para la recuperación de fibras nerviosas lesionadas”*, por Marta Lapid Volosin.

## Trabajo de Especialización



### **Primera Etapa en el desarrollo de un ELISA competitivo para la determinación de la proteína FABP-I aplicado a pacientes celíacos**

**Por Clarisa PASCUAL<sup>1</sup>, Julián BELGAMO<sup>2</sup>, Betina CÓRSICO<sup>2</sup>, Silvia G CORREA<sup>3</sup>**

1. Sanatorio Allende, Córdoba.
2. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)- CONICET, La Plata.
3. Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba

#### **RESUMEN**

La proteína intestinal de unión a ácidos grasos (FABP2 o I-FABP), ha sido propuesta como un marcador temprano y específico de daño de la mucosa del intestino delgado en la enfermedad celíaca (EC). Las concentraciones circulantes elevadas de I-FABP se asocian con grados crecientes de atrofia de las vellosidades intestinales y con la pérdida de la integridad de la barrera epitelial intestinal. Por lo tanto, esta proteína se podría utilizar como una herramienta más en el diagnóstico y seguimiento de esta patología.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un enzimo-inmuno ensayo (ELISA) competitivo, para lograr una detección altamente sensible de I-FABP, y cuantificar esta proteína en muestras de suero de pacientes con EC. Para ello, se sensibilizó una placa de ELISA con la proteína pura, y luego se aplicó una mezcla de anticuerpo específico anti I-FABP y competidor (proteína recombinante). Con el agregado de un anticuerpo 2rio y el sustrato correspondiente de la enzima del conjugado, se pudo revelar la reacción. Se realizó una curva de calibración con 6 concentraciones de I-FABP, en un rango de 4,12 a 140 ng/ml.

Mediante ensayos de inhibición, se pudo corroborar cómo concentraciones crecientes de la proteína I-FABP purificada, redujeron la unión del anticuerpo anti I-FABP a la I-FABP adsorbida a la placa, dando como resultado menor señal de absorbancia, a

mayores concentraciones de I-FABP y evidenciando así la competencia del anticuerpo primario específico por los sitios de unión al antígeno entre ambas proteínas: la I-FABP pegada a la placa y la I-FABP pura en solución.

## INTRODUCCION

La barrera intestinal es un elemento crucial para limitar la penetración de las bacterias del lumen y está integrada por el epitelio, el mucus, la IgA secretoria (IgAs) y proteínas y péptidos antimicrobianos, que inhiben y regulan el crecimiento de las bacterias en la proximidad del epitelio (1). Las células epiteliales promueven la absorción de agua y nutrientes y las proteínas de unión estrecha sellan el espacio entre las células adyacentes (2). El epitelio se renueva cada 5-7 días y la alta tasa de recambio de este tejido sirve como mecanismo protector para remover células dañadas o infectadas (1, 3).

La microbiota intestinal es en gran parte de naturaleza simbiótica (4) y cumple una función específica en el mantenimiento de la integridad estructural de la barrera, en la inmunomodulación (5) y en diversos procesos como la descomposición y absorción de nutrientes, la producción de vitaminas y hormonas y la prevención de la colonización por patógenos (4,5). Muchos de los efectos tróficos y estimulantes de la microbiota se atribuyen a los productos derivados de la actividad metabólica (6).

La gran especialización del sistema inmune residente en la mucosa intestinal ha posibilitado adaptaciones para cumplir funciones opuestas: permitir la coexistencia con la microbiota sin provocar inflamación franca y a su vez, proporcionar una respuesta efectora acorde a distintos tipos de patógenos. En el estado de homeostasis, el epitelio intestinal absorbe nutrientes y previene la translocación de bacterias lumbinales. La reacción inmune excesiva está regulada por mecanismos que mantienen el perfil no inflamatorio y contribuyen a la preservación de la mucosa intestinal (1,7). Cambios en la composición, funcionamiento o actividad metabólica de la microbiota (disbiosis) se asocian a alteraciones en la permeabilidad epitelial que promueven el ingreso de antígenos o estímulos a la lámina propia (LP) y provocan un incremento de señales estimuladoras que comprometen la integridad epitelial y pueden llevar a inflamaciones crónicas. Estos efectos están asociados a la patofisiología de una variedad de desórdenes gastrointestinales (8). Así, la incrementada permeabilidad de la barrera intestinal contribuye a la patogénesis de la enfermedad celíaca (EC), a las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), al síndrome de intestino irritable (SII) y a la alergia alimentaria (1). Por lo tanto, la evaluación de la permeabilidad intestinal y los mecanismos moleculares relacionados, podrían convertirse en un parámetro interesante a considerar en la práctica clínica para estudiar y monitorear estas enfermedades (9).

Se han propuesto varios biomarcadores plasmáticos y urinarios para medir la permeabilidad intestinal y la pérdida de la integridad de la barrera en las EII, como las proteínas de unión estrecha (TJs), la citrulina y la calprotectina (1, 10). Sin embargo, estas pruebas no serían lo suficientemente específicas porque muchas condiciones alteran la permeabilidad del intestino en general (11, 12).

La proteína que une ácidos grasos o lipocalina intestinal (FABP) representa el 2% de las proteínas citosólicas de los enterocitos maduros del intestino delgado y grueso (13). Es una proteína citosólica pequeña (14-15 kDa), soluble en agua que une con alta afinidad los ácidos grasos de cadena larga (FA) y otros ligandos hidrofóbicos y participa en la captación y el tráfico de lípidos (14, 15). En el intestino se detectan tres tipos de

FABP: la FABP intestinal (I-FABP) localizada predominantemente en el yeyuno y menos en el colon, la FABP hepática (L-FABP) presente en el hígado, riñón e intestino, y la proteína de unión a ácidos biliares ileal (II-FABP) de localización exclusiva en el íleon (13-15). Los enterocitos procesan los productos de hidrólisis de los lípidos de la dieta y las FABP son críticas para esta actividad (14).

Su detección en suero se asocia a la ruptura de la membrana de los enterocitos por lo que podría ser un marcador sensible del daño epitelial (9, 13, 14). Los niveles basales de la I-FABP reflejan el recambio fisiológico de los enterocitos (4), pero tras la destrucción celular, esta proteína se libera fácilmente a circulación sistémica (13). Los niveles elevados en sangre o en orina indicarían daño de la barrera intestinal, con relevancia pronóstica para la actividad de la EC (16). Dado que I-FABP está altamente expresada en la extremidad de las vellosidades, se la ha propuesto como un marcador temprano de daño intestinal en EC (17) y sus niveles séricos podrían servir para discriminar pacientes con EC de individuos controles sanos. En el suero de pacientes con dieta libre de gluten (GFD), los niveles de I-FABP son similares a controles, por lo que esta proteína podría emplearse para el seguimiento de la respuesta al tratamiento en EC (16). Por otra parte, individuos con sensibilidad al gluten no celíacos (NCWS) que muestran una variedad de síntomas en respuesta a la ingestión de trigo y cereales relacionados, pero sin marcadores serológicos, histológicos o genéticos de la EC, presentan altos niveles de I-FABP circulantes que se correlacionan fuertemente con los niveles de proteína que une LPS (LBP) y CD14 soluble (sCD14) (18). Estos hallazgos sugieren un vínculo entre el daño de las células epiteliales intestinales y la activación inmune sistémica en respuesta a productos microbianos trastocados (19). Es atractivo intentar implementar métodos de detección de esta proteína ya que existe la necesidad de biomarcadores no invasivos que reflejen los diferentes cambios de la mucosa intestinal.

La I-FABP puede medirse con alta sensibilidad en plasma, suero y orina utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (20). Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas, de forma que se consigue una elevada sensibilidad y detectabilidad en la técnica, lo que tendría una gran aplicabilidad en el diagnóstico clínico (21). Existen ensayos tipo ELISA sándwich no competitivo para FABP basados en el uso de dos anticuerpos monoclonales, el de captura y el detector que reconocen diferentes epitopes de la proteína (22-24). Dadas las características de la I-FABP detalladas anteriormente, sería relevante y útil, poder estandarizar un ensayo para medir con alta sensibilidad y especificidad los niveles de esta molécula en muestras de suero en nuestro medio. Considerando los elevados costos de los kits comerciales y la dificultad de adquirirlos regularmente nos propusimos realizar un ELISA competitivo adaptado de un trabajo previo, en el que se desarrolló un ELISA competitivo aplicado al control de alimentos aptos para celíacos (25), empleando un único anticuerpo específico anti I-FABP.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Antígeno**

#### **Obtención y purificación del antígeno (I-FABP recombinante de rata)**

El antígeno se obtuvo en el laboratorio de la Dra. Córscico (UNLP); se expresó ADNc de I-FABP de tipo salvaje de rata (con 90% de homología con la proteína humana y codificado en el plásmido pET-11a) en la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* (26).

#### **Lisis celular**

El pellet de bacterias se trató con buffer de lisis TEK hipotónico (10 mM Tris, 1 mM EDTA y 40 mM KCl), y se lisó en un sonicador de punta Branson en un baño de agua-hielo. Los restos de pared celular y complejos supramacromoleculares se descartaron centrifugando a 10000 rpm, 30 min a 4°C. Se colocó inhibidor de proteasas y DNasa para eliminar ADN interferente. El pellet se conservó para SDS-PAGE (verificación de pureza de la proteína en cada paso del proceso) y al sobrenadante se le agregó 10 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado y se incubó toda la noche a 4°C, en agitación para solubilizar la proteína.

#### **Purificación**

La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min en una centrífuga refrigerada, recuperándose las I-FABP en la fracción soluble. La purificación involucró dos pasos cromatográficos: exclusión por tamaño secuencial (Sephadex G-50) seguido de cromatografía de intercambio aniónico (DE-52), y finalmente delipidación usando una columna Lipidex-1000.

#### **Separación proteica**

##### **Columna G-50 Sephadex – Exclusión por tamaño secuencial**

Para el lavado de la columna se utilizó buffer fosfato (PO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 150 mM, pH=7,4) como eluyente; se reguló un flujo de 1ml/min y se sembraron aproximadamente 25 ml de sobrenadante. Se recolectaron los volúmenes eluidos con un colector de fracciones y se midió la absorbancia a 280 nm para evidenciar la proteína. La I-FABP eluyó como un pico importante luego de la mezcla de proteínas presentes en el volumen muerto de la columna. Se separaron los tubos de interés en donde había I-FABP y los 15 ml resultantes fueron dializados toda la noche a 4°C con 1000 ml de buffer Tris PO<sub>4</sub> 10 mM pH= 8,5.

##### **Columna Whatman DE-52 – Cromatografía de intercambio iónico**

El pool de I-FABP se eluyó usando buffer fosfato pH= 7,4 a través de una columna de intercambio aniónico DE-52 (GE Healthcare) de modo de eliminar el ADN contaminante. Con el pool de proteína se realizó un espectro de absorbancia de 200 a 300 nm de modo de evidenciar la ausencia del pico de ácidos nucleicos a 260 nm.

##### **Columna Lipidex 1000**

Finalmente, en el último paso de purificación se hizo la delipidación de la I-FABP pura utilizando una columna rellena con Lipidex 1000 (hidroxialcoxi-propil-dextran Tipo IV, Sigma) que retiene todos los sustratos hidrofóbicos. Se reguló un flujo de 0,5 ml/min a 37°C, con el mismo buffer fosfato pH=7,4. Se sembró toda la muestra obtenida de la corrida cromatográfica de intercambio iónico (Columna DE52), previa concentración de la proteína purificada en un dispositivo concentrador de presión positiva (Millipore) para alcanzar una concentración superior a 1 mg/ml, con el objetivo de prolongar la vida útil a -80°C.

El volumen sembrado fue aproximadamente de 7 ml y se usó buffer fosfato. Las fracciones obtenidas se midieron a 280 nm para determinar en qué tubos se encontraba la I-FABP. La proteína obtenida se alicuotó y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Anticuerpos

### Anticuerpo 1rio

Se usó un anticuerpo (Ac) anti I-FABP comercial de conejo (ITT 5874. Polyclonal Antibody Biosciences Geno Technology Inc., EEUU) que detecta I-FABP humana, de rata o de ratón; concentración 1 mg/ml.

### Anticuerpo 2rio

Se usó un Ac anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Anti rabbit IgG-peroxidase, Sigma A0545; solución en 0,01 M en buffer fosfato pH 7,4 conteniendo 0,05% de metilisotiazolinona como conservante), generosamente aportado por la Dra. Lilian Canavoso.

## Muestras y sujetos en estudio

Se trabajó con muestras de suero almacenadas en la seroteca del Sanatorio Allende, de pacientes y controles adultos, recolectadas por venopunción y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Criterios de inclusión: pacientes adultos de entre 18 y 60 años de ambos sexos, con EC o algún trastorno gastrointestinal.

Criterios de exclusión: Pacientes deficientes en IgA sérica.

**Grupo 1:** Pacientes recientemente diagnosticados con EC, triple positivos para Ac anti-transglutaminasa tisular, Ac anti-gliadinas deaminadas y Ac anti-endomisio. Biopsia intestinal positiva (N=24).

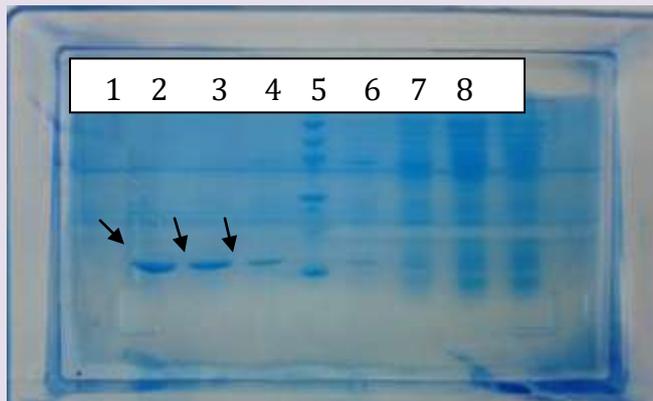
**Grupo 2:** Pacientes con EC diagnosticada, en tratamiento (EC-GFD), triple negativos para Ac anti-transglutaminasa tisular, Ac anti-gliadinas deaminadas y Ac anti-endomisio (N=24).

**Grupo 3:** Pacientes controles, con sintomatología gastrointestinal, no celíacos, triple negativos para Ac anti-transglutaminasa tisular, Ac anti-gliadinas deaminadas y Ac anti-endomisio (N=24).

## RESULTADOS

### 1. Caracterización de la I-FABP recombinante.

La obtención y purificación del antígeno (I-FABP recombinante de rata) se hizo como se describió en Materiales y Métodos. Luego de la purificación, se calculó la concentración en base a la absorbancia a 280 nm utilizando como coeficiente de extinción molar,  $\epsilon$  I-FABP= 16900 (27). La pureza de las proteínas purificadas se evaluó mediante una corrida electroforética en un gel de SDS-PAGE 15% (Figura 1).

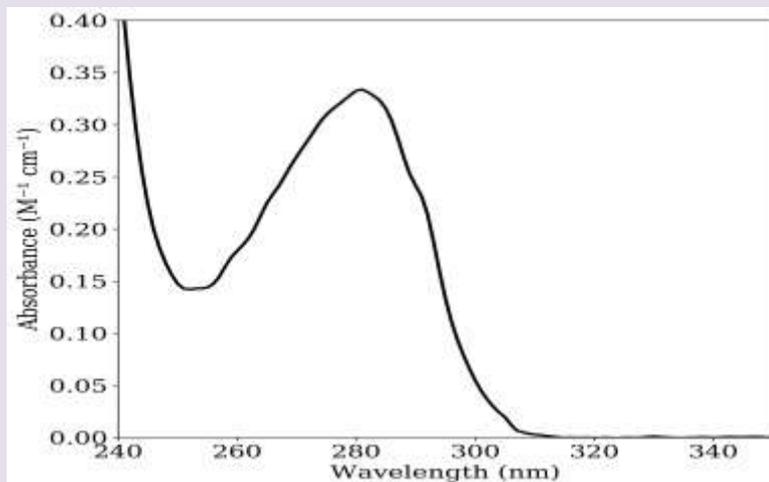


- 1: Tubo en el que eluye la proteína
- 2: Tubo en el que eluye la proteína
- 3: Tubo en el que eluye la proteína
- 4: Marcador de PM
- 5: Pellet y sobrenadante de lisis
- 6: Pellet y sobrenadante de lisis
- 7: Pellet y sobrenadante de lisis
- 8: Pellet y sobrenadante de lisis

**Figura 1. Evaluación de la pureza de la I-FABP recombinante de rata.** A) SDS PAGE y tinción con azul Coomassie. La flecha muestra la I-FABP en los tubos de las fracciones colectadas de mayor pureza de proteína.

## 2. Espectro de I-FABP

La Figura 2 muestra el espectro de absorbancia de la I-FABP (solución al 1% v/v) en el rango 240-320 nm donde se observa la estructura conservada de la proteína I-FABP a 280 nm de longitud de onda. Este control se realizó ya que transcurrió un periodo de almacenamiento a -80°C mayor del planificado originalmente.



**Figura 2.** Espectro a 280 nm de la I-FABP recombinante.

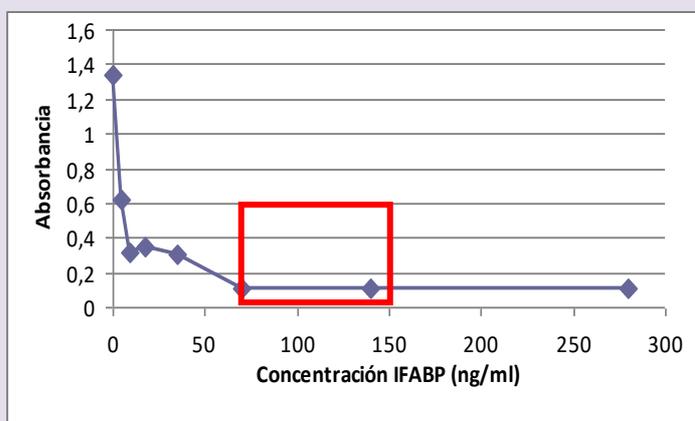
## 3. Optimización de variables experimentales:

Para la implementación del ensayo de ELISA se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Concentración óptima de I-FABP purificada a inmovilizar en la placa que permita tener una señal detectable
- b) Tipo de material de la placa para desarrollar el ensayo
- c) Dilución óptima del Ac anti I-FABP

**a) Concentración óptima de I-FABP a inmovilizar**

La concentración óptima de I-FABP a inmovilizar se evaluó mediante el método de saturación con peroxidasa (25). Se utilizaron diferentes concentraciones de I-FABP (4,4-280 ng/ml) y una concentración fija y saturante de peroxidasa (1 mg/ml) la cual se adsorbe en los sitios no ocupados por la proteína en la placa. La actividad enzimática se detectó con una solución reveladora de TMB (Orgentec, Diagnostika GmbH, Mainz, Alemania) que se incubó al resguardo de la luz durante 5 min. La reacción se detuvo con una solución ácida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se midió la absorbancia a 450 nm. La señal generada fue inversamente proporcional a la cantidad de I-FABP inmovilizada. La concentración óptima de I-FABP para sensibilizar la placa de ELISA fue de 100 ng/ml (Figura 3).



Concentración (ng/ml)	Abs
0	1,34
4,4	0,621
8,8	0,321
17,5	0,349
35	0,309
70	0,104
140	0,114
280	0,11

**Figura 3.** Determinación de la concentración óptima de I-FABP para sensibilización de la placa de ELISA

**b) Tipo de material de la placa para desarrollar el ELISA**

Se probaron dos superficies sólidas diferentes: placas de poliestireno convencionales o de poliestireno luego de irradiación gamma donadas generosamente por el Dr. Chamley (28). En el caso de las placas convencionales, con todas las diluciones de la I-FABP evaluadas se observaron absorbancias similares, sin diferencias significativas. Sin embargo, con el material irradiado, a mayor concentración de I-FABP las absorbancias debidas a la peroxidasa adsorbida fueron menores (datos no mostrados). Se pudo determinar así que la I-FABP no se une de igual manera a cualquier superficie siendo las placas de poliestireno con irradiación gamma las que mostraron mejor adsorción y desplazamiento de la peroxidasa, por lo que los restantes ensayos se hicieron en este tipo de placas.

**c) Dilución óptima de conjugado**

En placa de poliestireno según punto b) se inmovilizó I-FABP 100 ng/ml, se bloqueó con albúmina sérica bovina (ASB) al 3% en PBS-Tween y se probaron diluciones seriadas del Ac 1rio (**1:500 a 1:32000**) en PBS 1x, pH=7; luego de la incubación (1 hora a 37°C) se realizó el lavado correspondiente y se agregó el Ac 2rio (diluciones: **1:3000 y 1:6000**) y se incubó 1 hora más a 37°C. Se realizaron los lavados y se adicionó la solución reveladora de TMB. Se frenó la reacción con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se midió la absorbancia

a una longitud de onda de 450 nm. En todos los casos (antígeno y Acs) el volumen usado fue de 50 µl por pocillo.

En base a las absorbancias obtenidas con las diluciones analizadas y a los menores niveles de background (datos no mostrados), se seleccionaron como óptimas para el ensayo la dilución 1:500 para el Ac 1rio y 1:5000 para el Ac 2rio.

#### 4. Inhibición usando I-FABP recombinante soluble

Para establecer la inhibición de los sitios activos del Ac 1rio se sensibilizó la placa con I-FABP (100 ng/ml) y se realizó una curva de calibración con 6 concentraciones de I-FABP, en un rango de 4,12 a 140 ng/ml; la placa se incubó con el Ac 1rio sólo (representa el 100% unión), el Ac 2rio sólo (blanco de reacción) o el Ac 1rio luego de una incubación a 37°C por 60 min con las 6 concentraciones conocidas de I-FABP (Figura 4).

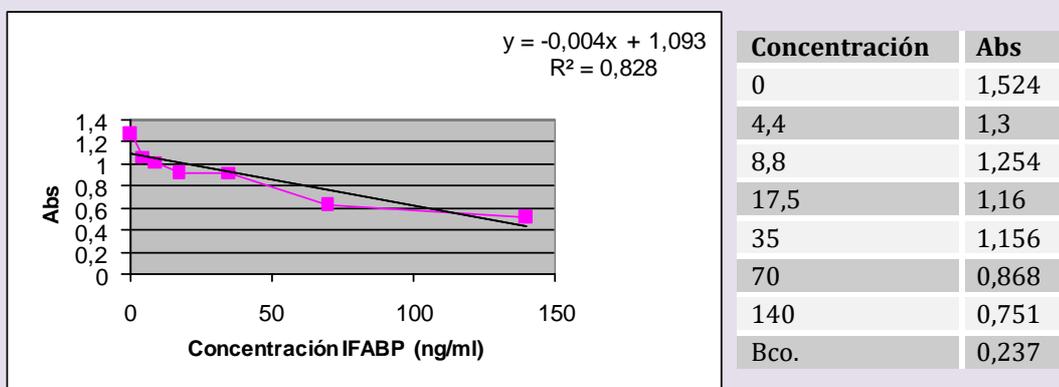


Figura 4. Ensayo de inhibición usando I-FABP recombinante

La ecuación de la regresión lineal obtenida fue  $y = -0,0047x + 1,0939$  en el rango de 0-140 ng/ml de I-FABP.

El R2 obtenido fue 0,8285.

El coeficiente de correlación para este gráfico fue  $r = -0,9102$ .

#### 5. Valoración de las muestras de pacientes con EC

Se sensibilizaron placas de poliestireno irradiadas con 50 µl de una solución de I-FABP 100 ng/ml. Para la determinación de I-FABP, se realizaron diluciones del suero de los pacientes 1/10, y se incubaron 50 µl de esas diluciones con 50 µl del Ac 1rio dilución 1/500, en tubos individuales por una hora a 37°C. Posteriormente, 50 µl de cada dilución se colocó en la placa de ELISA previamente sensibilizada y bloqueada y se incubó por 1 hora a 37°C. El Ac 2rio diluido 1:5000 se incubó una hora a 37 °C y se continuó con el ELISA como se describió anteriormente.

Para poder evidenciar la utilidad del ensayo propuesto, se trabajó con tres grupos de pacientes: celíacos al diagnóstico, vírgenes de tratamiento; celíacos tratados y pacientes no celíacos. A todos se les midió la I-FABP y luego con los datos obtenidos se procedió a calcular el porcentaje de inhibición del ensayo (Tabla 1). Se hicieron 3 experimentos similares empleando en cada caso 8 sueros por grupo.

**Tabla 1.** Inhibición con muestras de los grupos en estudio

	<i>Pacientes Triple Positivos (N=8)</i>	<i>Pacientes Triple Negativos (N=8)</i>	<i>Pacientes No Celíacos (N=8)</i>
	<b>% de Inhibición</b>		
<b>Experimento 1</b>	70,88 ± 25,54	76,42 ± 31,16	72,29 ± 11,16
<b>Experimento 2</b>	76,21 ± 14,67	86,63 ± 14,55	74,42 ± 16,56
<b>Experimento 3</b>	59,08 ± 17,90	73,96 ± 10,17	69,87 ± 15,95

## DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ELISA competitivo para la detección y cuantificación de I-FABP en muestras de suero de pacientes con EC, pacientes celíacos en tratamiento, y pacientes con algún trastorno/sintomatología intestinal, con patología celiaca descartada.

Los enterocitos de la parte superior de las vellosidades son el sitio inicial de destrucción en numerosas enfermedades intestinales (16). La I-FABP podría usarse como un marcador de lesión dada su alta especificidad y abundancia en este tejido, y su liberación rápida a circulación después de la lesión de la mucosa del intestino delgado (24).

Para la realización del ensayo se obtuvo la proteína I-FABP recombinante purificada, con una banda única en un SDS-PAGE, con una concentración de 0,2 mM. El espectro mostró un pico a 280 nm que corresponde a 2 triptófanos (en posición 6 y 82) y dos clusters de cadenas laterales aromáticas, uno formado por Fen47, Fen62 y Trp82 y el segundo que involucra Tyr14, Fen17, Tyr17 y Tyr19 (29).

Para el ensayo propuesto, se pudo determinar la matriz sólida más adecuada a utilizar, la concentración óptima de antígeno para sensibilizar la placa, así como también la dilución de los Acs primario y secundario que generaron una mejor señal de absorbancia. Se pudo corroborar, además, mediante ensayos de inhibición, cómo concentraciones crecientes de I-FABP purificada, generaron un buen desplazamiento del complejo Ac anti-I-FABP-I-FABP soluble, dando como resultado menor señal de absorbancia, a mayores concentraciones de I-FABP. Se pudo evidenciar claramente, la competencia por los sitios de unión al antígeno, del Ac primario específico, con ambas proteínas: I-FABP pegada a la placa e I-FABP en solución, generando mayor disociación del Ac primario unido al antígeno pegado a la placa.

Se han desarrollado ensayos tipo ELISA sándwich no competitivo para FABP basados en el uso de dos Acs monoclonales, el de captura y el detector que reconocen diferentes epitopes de la proteína (22-24). En uno de estos ensayos, el ELISA no mostró ninguna reactividad cruzada con otros tipos de FABP e indicó excelentes características cuantitativas como reproducibilidad, linealidad de dilución y recuperación, indicando que con esta metodología se podrían medir con precisión las concentraciones séricas de I-FABP (24). A su vez, las curvas de calibración emplearon un rango de 0 a 50 ng/ml de I-

FABP, con un aumento de la absorbancia dependiente de la concentración (22). Además, estos autores determinaron el valor de referencia de I-FABP circulante en suero en una población sana, que fue de 2,0 ng/ml o menos, y esto no se vio afectado por sexo y/o edad (26) o 1,6 µg/L (24). El límite de detección fue lo suficientemente bajo para permitir la determinación precisa de las concentraciones de FABP en individuos sanos, y a su vez el rango amplio de medición usado permitió que las muestras de pacientes incluyan a más del 90% de las concentraciones de FABP informadas en muestras patológicas (23, 24). En base a estos reportes previos, en este trabajo se seleccionó un rango de 4,12 a 140 ng/ml de I-FABP para la calibración.

El ELISA competitivo, con inmovilización de la proteína pura en la placa fue adaptado de un trabajo previo (25), en el que se desarrolló un ELISA competitivo aplicado al control de alimentos aptos para celíacos. El método actual del Codex Tipo I para el análisis del gluten es el método ELISA R5 Méndez, que se calibra con el estándar de gliadina del Grupo de trabajo de prolamina (PWG) y es utilizado por los sistemas de control oficiales en toda Europa (30). El anticuerpo R5 es producido contra omega-Secalin de centeno con un límite de detección de 3 mg / kg de gluten y un rango de cuantificación de 5-80 mg / kg de gluten. Se pueden utilizar dos tipos de ELISA R5: sándwich y competitivo. El ELISA tipo sándwich R5 ha servido como prueba estándar de la industria alimentaria para el gluten, pero no es eficaz para identificar fragmentos hidrolizados mientras que el ELISA competitivo R5 es más sensible a los pequeños segmentos de proteínas que se encuentran en los alimentos fermentados.

En el ELISA competitivo diseñado, esperábamos, en base a estos alentadores ensayos previos con la proteína purificada, encontrar diferencias significativas entre los grupos seleccionados de pacientes, que determinarían una disparidad entre individuos con la enfermedad recién diagnosticada, e individuos en tratamiento y controles. Sin embargo, los valores de absorbancia obtenidos en las muestras de pacientes, no mostraron diferencia significativa alguna entre los grupos, siendo en todos los casos, valores de absorbancia bajas, que se corresponderían con altas concentraciones de proteína.

Uno de los factores que podría haber influido, es la gran concentración de proteínas de los sueros, ya que usamos diluciones 1:10, pudiendo haber interacciones no específicas con los Acs que impidieran la unión específica con el antígeno adsorbido la placa. Otra limitación de nuestro ensayo podría ser el uso de un Ac policlonal, ya que algunos autores han reportado que utilizando sólo un tipo de Ac policlonal de conejo para medir concentraciones de I-FABP los resultados no resultaron satisfactorios en términos de sensibilidad y especificidad (31). Los compuestos endógenos que interfieren comúnmente con los inmunoensayos clínicos incluyen hemoglobina, bilirrubina y paraproteínas y pueden producir resultados falsamente aumentados cuando los interferentes entrecruzan los Acs de captura y detector y simulan la presencia del analito, lo que podría haber ocurrido con las muestras del grupo no celíaco (32). La combinación de Acs monoclonales y policlonales sería más adecuada para el uso en la investigación y la química clínica de I-FABP porque de esa manera se reconocerían epitopes nativos y desnaturalizados, lo que sería fundamental en muestras de sangre (31).

Otro factor a tener en cuenta es que quizá en los pacientes en tratamiento, los niveles de I-FABP persistieron altos, a pesar de la ausencia de atrofia de las vellosidades

y los niveles negativos de IgA-tTG. Esto sería indicativo de daño intestinal de bajo grado, incluso después del inicio del tratamiento. En este sentido, el daño de la mucosa en la EC en edad adulta es de recuperación lenta e incompleta (13). De acuerdo con esto, en un estudio de la I-FABP en pacientes con EII usando un ELISA “in house”, se demostró que los niveles plasmáticos de I-FABP no difirieron entre la enfermedad endoscópica activa y la remisión tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerativa. Sólo cuando se empleó una estricta combinación de clínica con bioquímica para estratificar a los pacientes se observó una reducción de la I-FABP en colitis activa (33). Notablemente, estos autores determinaron valores de I-FABP (mediana de 125 y 147 pg /ml) en enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa más bajos que los informados en pacientes con EC no tratados y con atrofia de las vellosidades. Empleando un ELISA “in house” altamente específico que detecta selectivamente I-FABP humana, se fijó un valor de cut-off de 382 pg / ml para discriminar entre pacientes con EC y sin EC (13). Estos autores encontraron niveles séricos de I-FABP significativamente elevados en pacientes con EC no tratada (mediana: 691 pg / ml); en individuos controles con sospecha de EC y prueba de Acs negativa, la concentración de I-FABP fue 178 pg / ml, surgiendo que esta proteína podría aportar una distinción fisiopatológica entre EC y las EII. En otro estudio, se observó un nivel significativamente mayor de I-FABP en pacientes con EC y una buena correlación entre el nivel de I-FABP y la anomalía de las vellosidades, pero los valores de I-FABP no mostraron un patrón específico (34). Estos autores usaron kits comerciales y propusieron un valor de corte óptimo de I-FABP  $\geq$  1100 pg / mL para indicar la presencia de una anomalía vellosa de grado Marsh  $\geq$  2 con una sensibilidad del 39,7% y especificidad del 95,5% (34). Por otra parte, en un meta-análisis evaluando la relevancia de la I-FABP como biomarcador de obstrucción intestinal por estrangulamiento, se demostró un alto grado de heterogeneidad entre los 8 estudios incluidos, lo que se atribuyó a diferencias en la condición de los pacientes y el momento de la colección de muestras de sangre, los Acs usados para el ELISA y el tamaño de la muestra (14).

A pesar de no haber podido desarrollar el ensayo por inhibición es importante continuar trabajando en la implementación de una alternativa local, ya que los kits comerciales son casi inaccesibles para su uso clínico. En resumen, para poder utilizar la determinación de I-FABP en suero en la práctica clínica, se necesitan más estudios que involucren un gran número de muestras y procedimientos validados, para poder contrastar los resultados de la nueva técnica, frente a un ensayo “gold estándar”, que permita realizar una comparación de métodos, además de valorar una población más grande de pacientes para tener una muestra más representativa de lo que realmente podría estar ocurriendo en los distintos trastornos.

### Referencias

1. Wells JM y col. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312:G171–G193.
2. Wang L y col. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods* 2015; 421:44–53.
3. Rodríguez-Colman MJ y col. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* 2017; 543(7645):424-427.
4. Bischoff SC y col. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014; 14:189.

5. Jandhyala SM y col. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015; 21(29): 8787-8803.
6. Rooks MG y col. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(6):341-52.
7. Yap YA y col. An insight into the intestinal web of mucosal immunity, microbiota, and diet in inflammation. *Front Immunol* 2018; 9:2617.
8. Ryu Okumura y col. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med* 2017; 49: e338.
9. Linsalata M y col. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. *BMC Gastroenterology* 2018; 18:167.
10. Samant H y col. Fecal calprotectin and its correlation with inflammatory markers and endoscopy in patients from India with inflammatory bowel disease. *Indian J Gastroenterol* 2015; 34(6):431-5.
11. Bjarnason I y col. Comparison of four markers of intestinal permeability in control subjects and patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29 (7): 630–639.
12. Cox MA y col. Measurement of small intestinal permeability markers, lactulose, and mannitol in serum: results in celiac disease. *Dig Dis Sci* 1999; 44 (2):402–406.
13. Adriaanse MPM y col. Serum I-I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 482–490.
14. Wu C y col. Intestinal fatty acid-binding protein as a biomarker for the diagnosis of strangulated intestinal obstruction: A meta-analysis. *Open Med (Wars)*. 2021;16(1):264-273.
15. Gajda y col. Storch. Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (I-FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- I-FABPs in the Intestine. *Prost Leuk Essent Fatty Acids* 2015; 93:9–16.
16. Bottasso Arias NM y col. Expression Pattern of Fatty Acid Binding Proteins in Celiac Disease Enteropathy. *Mediators Inflamm* 2015; 738563.
17. Vreugdenhil AC y col. Additional value of serum I-I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46(12):1435-41.
18. Carroccio A y col. Non-Celiac Wheat Sensitivity Diagnosed by Double-Blind Placebo-Controlled Challenge: Exploring a New Clinical Entity. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1898–1906.
19. Uhde M y col. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut* 2016; 65:1930–1937.
20. Sarikaya M y col. Intestinal fatty acid binding protein (I-I-FABP) as a promising test for Crohn's disease: a preliminary study. *Clin Lab* 2015; 61(1-2):87-91.
21. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. Quinta Edición, Editorial Harcourt (2000).
22. Funaoka H y col. Development of a High-specificity Sandwich ELISA System for the Quantification of Human Intestinal Fatty Acid-Binding Protein (I-FABP) Concentrations. *Immunol Invest* 2011; 40:223–242.
23. Wodzig KW y col. One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid-binding protein. *Ann Clin Biochem* 1997; 34:263-8.
24. Funaoka H y col. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases. *Rinsho Byori*. 2010; 58(2):162-8.

25. Messina, GA. Desarrollo de un enzoinmunoensayo competitivo aplicado al control de alimentos para celíacos. Tesis de Maestría en Inmunología. Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. 2019.
26. Córscico B y col. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(21):12174-8.
27. Richieri y col. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB, J Biol Chem 1994 ;269(39):23918-30.
28. Chamley LW y col. Conformationally altered beta 2-glycoprotein I is the antigen for anti-cardiolipin autoantibodies. Clin Exp Immunol 1999; 115(3):571-6.
29. Sacchettini JC y col. Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. J Mol Biol 1989; 208:327-39.
30. Hochegger R y col. Comparison of R5 and G12 Antibody-Based ELISA Used for the Determination of the Gluten Content in Official Food Samples. Foods 2015;4(4):654-664.
31. Satoshi K y col. Establishment and Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies Against Human Intestinal Fatty Acid-Binding Protein (I-FABP) using Synthetic Regional Peptides and Recombinant I-FABP. J Immunoassay & Immunochem 2008; 29: 19–41.
32. O'Regan TM y col. Development of a disposable immunosensor for the detection of human heart fatty-acid binding protein in human whole blood using screen-printed carbon electrodes. Talanta. 2002;57(3):501-10.
33. Bodelier AG y col. Plasma intestinal fatty acid-binding protein fails to predict endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease patients. Eur J Gastroenterol Hepatol 2016; 28:807-13.
34. Singh A y col. Non-immunological biomarkers for assessment of villous abnormalities in patients with celiac disease. J Gastroenterol Hepatol. 2020;35(3):438-445.

## Trabajo de Especialización

### **ABSCESO HEPATICO Y BACTERIEMIA POR *Schaalia odontolytica* EN UN PACIENTE INMUNOCOMPROMETIDO.**

**Por Valenti, María Eugenia. Bioquímica ; Mobilia Liliana. Especialista en bacteriología clínica; Boleas Mariana. Especialista en bacteriología clínica; Alcázar Gabriela. Especialista en bacteriología clínica; Prestifilippo, Ana. Especialista en bacteriología clínica. Piedrabuena Milagros. Especialista en bacteriología clínica; Calgaro, Maillen. Especialista en bacteriología clínica. Laboratorio de microbiología clínica. Hospital San Martín. Presidente Perón 450. Paraná, Entre Ríos.**

#### **Resumen**

Se presenta un caso clínico de un absceso hepático con bacteriemia por *Schaalia odontolytica*, bacilo Gram positivo del género *Actinomyces*, que es miembro de la microbiota habitual del tracto orofaríngeo humano y bajo ciertas circunstancias puede actuar como patógeno oportunista. Esta especie es una causa poco frecuente de actinomicosis abdominal. Debido a su curso insidioso y a la naturaleza inespecífica de los síntomas que produce, es importante su diagnóstico diferencial para el abordaje del tratamiento adecuado. Se destaca en el caso presentado, la cirugía abdominal previa e inmunosupresión de la paciente como factores para la sospecha de microorganismos oportunistas y para la incubación prolongada de los cultivos, contemplando la necesidad del uso de técnicas moleculares como herramientas diagnósticas.

#### **Abstract**

Presented here is a case of hepatic abscess with bacteremia due to *Schaalia odontolytica*, Gram-positive bacilli of *Actinomyces* genus, which is a member of the human oropharynx tract and under certain circumstances, can act like opportunistic pathogen. This specie is an infrequent cause of abdominal actinomycosis. Because the insidious course and the nonspecific nature of the symptoms, its differential diagnosis is crucial for the accurate treatment. On this particular case, is highlighted the previous abdominal surgery and immune suppression stand out as factors for the suspicion of opportunistic pathogens and for the prolonged incubation of cultures, considering the need to use molecular techniques as diagnostic tools.

**Palabras clave:** absceso hepático, actinomicosis, *Schaalia odontolytica*

## Introducción

La actinomicosis es una enfermedad crónica invasiva producida por bacterias del género *Actinomyces*, caracterizada por la formación de abscesos, trayectos fistulosos y fibrosis tisular. El compromiso hepático es de baja incidencia y el aislamiento de *Schaalia odontolytica* como agente causal, un hallazgo poco frecuente (1,2,3).

*Schaalia odontolytica* (ex *Actinomyces odontolyticus*) es un bacilo Gram positivo o a menudo Gram variable, recto o ligeramente curvo con filamentos delgados con ramificaciones, anaerobio estricto o facultativo, no esporulado, no ácido resistente e inmóvil. Se pueden observar con frecuencia como bastones más cortos dispuestos en empalizada u otros arreglos difteroidales (2,4).

Este microorganismo de baja virulencia, forma parte de la microbiota habitual del tracto orofaríngeo y ha sido aislado del tracto genitourinario en pacientes que utilizan dispositivos intrauterinos (4). Es considerado un patógeno oportunista, que bajo ciertas circunstancias en la que existe disrupción de la integridad de mucosas, puede diseminarse por vía hematológica y simular otras enfermedades como procesos malignos, tuberculosis o nocardiosis. Constituyen importantes factores de riesgo, cirugías abdominales y pélvicas, pobre higiene dental, inmunosupresión, enfermedades del tracto biliar, uso de dispositivos intrauterinos por tiempos prolongados y el abuso de drogas intravenosas (1,5,6,7).

*Actinomyces* spp son susceptibles a los betalactámicos, y especialmente a la penicilina G o amoxicilina. Su combinación con inhibidores de betalactamasas constituyen el tratamiento de elección. En individuos alérgicos a la penicilina, eritromicina, clindamicina y doxiciclina han sido reportados como alternativas efectivas. Metronidazol, fluorquinolonas y aminoglucósidos tienen escasa actividad. La resección quirúrgica de tejido infectado o el drenaje de abscesos permitirían acortar el tratamiento antibiótico y prevenir las recurrencias (3,6,8).

## Presentación de caso clínico

Paciente femenina de 52 años de edad que ingresa a la guardia del Hospital San Martín de Paraná por un cuadro dolor abdominal epigástrico de 48 horas de evolución de tipo continuo e intenso asociado a ictericia mucocutánea, coluria, hipocolia y malestar general.

Presenta como patología de base adenocarcinoma de vesícula biliar y niega hábitos tóxicos. Como antecedente, refiere haber sido sometida a una cirugía por su adenocarcinoma 6 meses atrás, en la cual se procedió a la resección de la misma y se realizó quimioterapia. Además, se encontraba en tratamiento con ciprofloxacina por un período de 2 semanas por una complicación del procedimiento con bacteriemia por *Escherichia coli*, la cual también fue recuperada en líquido biliar.

Al momento del ingreso, la paciente se encontraba afebril y los exámenes de laboratorio revelaron: leucocitosis, anemia, hepatograma y coagulograma alterados.

Se realiza ecografía y TAC de abdomen que evidenciaron lesión hipodensa en hipocondrio izquierdo sugestivo de un absceso hepático. Se toman muestras de hemocultivos y se practica drenaje percutáneo del absceso hepático recuperándose material purulento que se envía para su cultivo. Se rota el esquema antibiótico a ampicilina-sulbactam por vía intravenosa.

Los dos frascos de hemocultivos se positivizan a las 48 horas de incubación y en la coloración de Gram de los mismos se observan bacilos Gram positivos difteroidales, algunos con ramificaciones cortas, tinción de Ziehl Neelsen y de Kinyoun negativas. En la coloración de Gram del absceso hepático se observan bacilos Gram positivos

difteroidales asociados a una flora polimicrobiana con característica de anaerobios (Figura 1).

Los cultivos de ambas muestras en agar sangre y agar chocolate se positivizan a las 72 horas de incubación en atmosfera enriquecida en dióxido de carbono al 5%, recuperándose colonias de blancas a grisáceas, pequeñas, con aspecto rugoso y seco, no beta-hemolíticas (Figura 2). Se realizan las siguientes pruebas bioquímicas para diferenciar del resto de bacilos Gram positivos ramificados, prueba de catalasa negativa, ausencia de pigmento amarillo, metabolismo fermentativo, gas de glucosa negativa, prueba de CAMP reversa negativa, presencia de halos de inhibición a vancomicina y penicilina, pruebas de indol, esculina y ureasa negativa. Con estas pruebas no fue posible identificar a nivel de género y especie, por lo que se informa de manera preliminar como grupo *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*.

Los cultivos se envían al Instituto Malbrán donde se realiza espectrometría de masas por metodología MALDITOF-MS y se identifica como *Shaalía odontolytica* (ex *Actinomyces odontolyticus*).

A los 45 días de comenzado el tratamiento antibiótico la paciente fallece por su patología de base por lo que no fue posible establecer la evolución del tratamiento.



Figura 1



Figura 2

Imagen 1: coloración de Gram del absceso hepático: bacilos Gram positivos difteroides asociada a flora polimicrobiana.

Imagen 2: colonias blanco-grisáceas del cultivo en agar chocolate del absceso hepático.

### Discusión y conclusiones

La actinomicosis abdominal continúa siendo una enfermedad poco frecuente o subdiagnosticada que puede simular otras enfermedades inflamatorias o procesos neoplásicos. Su curso insidioso, sumado a los síntomas inespecíficos con que se presenta, hacen que su diagnóstico sea un desafío (9,10).

Los síntomas más frecuentes son fiebre, dolor abdominal y pérdida de peso y puede presentarse con leucocitosis, aumento de enzimas hepáticas y signos de inflamación sistémica (10, 11). Si bien son síntomas inespecíficos, estuvieron presentes en nuestro caso.

En las técnicas por imagen, puede observarse como una lesión hipodensa o como múltiples abscesos, siendo necesario distinguirla de procesos malignos y otras enfermedades granulomatosas (10, 11, 12). En escasas ocasiones es posible arribar al diagnóstico sin realizar el procedimiento quirúrgico (5, 6). En este caso, pudo identificarse de manera prequirúrgica la lesión como un absceso y obtener muestra para su cultivo.

La posibilidad de una infección actinomicótica debe sospecharse ante presentaciones abdominales atípicas, particularmente si existe historial previo de cirugías o traumatismos abdominales (3, 13). Aunque la actinomicosis hepática no se sospechaba

inicialmente, fue determinante el diagnóstico microbiológico en las muestras de absceso y hemocultivos.

El mecanismo de patogénesis es aún desconocido, pero existe evidencia de que el daño previo de la integridad de mucosas es necesario para que se produzca la infección (3), situación que podría haber sido la causa en este caso debido a que la paciente fue sometida a cirugía abdominal y quimioterapia. El compromiso hepático y la bacteriemia ocurrieron probablemente por diseminación hematogena a través de la vena porta desde otro sitio de infección (3, 12, 13).

El diagnóstico definitivo está basado en el cultivo microbiológico, sin embargo, el aislamiento y la identificación ocurre en la minoría de los casos. La falla en su recuperación puede atribuirse a tratamientos antibióticos previos, a la inhibición por otros microorganismos presentes, las condiciones de cultivo o tiempos de incubación inadecuados (1, 10, 11). Aunque la paciente se encontraba en tratamiento con ciprofloxacina al momento de la obtención de las muestras, no interfirió en la recuperación del agente patógeno ya que tiene pobre actividad contra *Actinomyces spp.*

La coloración de Gram de las muestras es más sensible que el cultivo, especialmente en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico (1,10,11). Las técnicas de coloración de Kinyoun y Ziehl Nielsen negativas permitieron descartar en primera instancia nocardiosis o tuberculosis y la observación de bacilos Gram positivos en la tinción de Gram, establecer el diagnóstico probable de actinomycosis.

Debido a que es un microorganismo fastidioso en cuanto a las características nutricionales y a su lento desarrollo, son necesarios medios enriquecidos y tiempos prolongados de incubación para su recuperación. (1,2)

La identificación de bacilos Gram positivos poco frecuentes en las infecciones clínicas suele ser compleja con los métodos convencionales disponibles en un laboratorio microbiológico clínico. En este caso, fue necesario recurrir a la técnica de espectrometría de masas MALDITOF que actualmente constituye una metodología certera y rápida de identificación (1,14).

### Referencias bibliográficas

- 1- Valour F., Sénéchal A., Dupieux C., Karsenty J., Lustig S., Breton P. y col.. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist.* (2014) 7: 183-197.
- 2- Smego R.A. Jr., Foglia G. Actinomycosis. *Clin Infect Dis.* (1998) 26: 1255-1261.
- 3- Garner J.P., Macdonald M., Kumar P.K. Abdominal Actinomycosis. *Int J Surg.* (2007) 5: 441-448.
- 4- Cone L.A., Leung M.M., Hirschberg J. *Actinomyces odontolyticus* bacteremia. *Emerg Infect Dis.* (2003) 9: 1629-1632.
- 5- Galata C.L., Vogelmann R., Gaiser T., Post S., Horisberger K. Abdominopelvic Actinomycosis in three different locations with invasion of the abdominal wall and ureteric obstruction: An uncommon presentation. *Int J Surg Case Rep.* (2015) 12: 48-51.
- 6- Petrache D., Popescu G.A. Successful switch to oral therapy with doxycycline in the case of an actinomycotic hepatic abscess. *J Infect Dev Ctries.* (2013) 7: 421-423.
- 7- Wong J.J., Kinney T.B., Miller F.J., Rivera-Sanfeliz G. Hepatic actinomycotic abscesses: diagnosis and management. *AJR Am J Roentgenol.* (2006) 186: 174-176.
- 8- Smith A.J., Hall V., Thakker B., Gemmel C.G. Antimicrobial susceptibility testing of *Actinomyces* species with 12 antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* (2005) 56: 407-409.

- 9- Acevedo F., Baudrand R., Letelier L.M., Gaete P. Actinomycosis: a great pretender. Case reports of unusual presentations and a review of the literature. *Int J Infect Dis.* (2008) 12: 358-362.
- 10- Filipa A., Santos V., Massinha P. Pereira J.R., Quintanilha R., Figueiredo A. Hepatic Actinomycosis. *GE Port J Gastroenterol.* (2015) 22: 19-23.
- 11- Wagenlehner F.M.E., Morhen B., Naber K.G., Männl H.F.K. Abdominal actinomycosis. *Clin Microb Infect.* (2003) 9: 881-885.
- 12- Grossen A., Magguilli M., Thai T.C., Salem G. Hepatic actinomycosis in a patient with retained common bile duct stent. *ACG Case Rep J.* (2019) 6: 1-3.
- 13- Lall T., Shehab T.M., Valenstein P. Isolated hepatic actinomycosis: a case report. *J Med Case Reports.* (2010) 4: 1-4.
- 14- Gajdács M., Urbán E., Terhes G. Microbiological and clinical aspects of cervicofacial *Actinomyces* infections: an overview. *Dent J.* (2019) 7: 1-16.

## Trabajos

***Nanoplataformas sintéticas, Bio-conjugadas e inmunológicas para diagnóstico y desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades infecciosas.***

***Bioconjugated, Immunological and Synthetic Nanoplatforms for diagnoses and development of new treatments for infectious diseases.***

***Por Luna R. Gomez Palacios [1], Sofia Martinez [3], Cecilia Tettamanti [3], Daniela Quinteros [3], Guillermo Bracamonte [1], [2]***

***[1]. Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC). Centro Laser del INFIQC, y Departamento de Química Orgánica del INFIQC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.***

***[2]. Departement de chimie et Centre d'optique, photonique et laser (COPL), Université Laval, Québec (QC) G1V 0A6, Canada.***

***[3]. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina***

### Indice

Resumen

1. Introducción
2. Estrategias para el diseño de vacunas y nuevos tratamientos en base al control desde moléculas hacia la Nano-escala
3. Importancia de la Bioconjugación en la Nano-escala.
4. Conclusiones y perspectivas Futuras

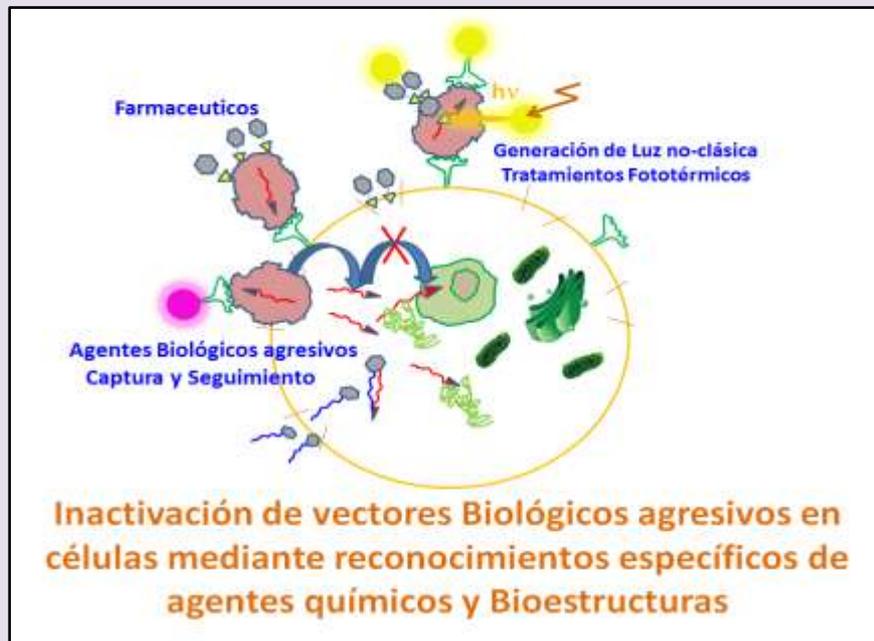
## Resumen

En esta comunicación se ha abordado diferentes temas implicados en el desarrollo de nuevos tratamientos y vacunas aplicadas a patologías desarrolladas en el ser humano tal como las producidas por virus. En este contexto se han presentado y discutido diferentes estrategias utilizadas, las cuales contemplan desde el diseño de moléculas pequeñas hacia mayores estructuras químicas y nuevas Nano-estructuras. En particular se ha discutido estudios para el tratamiento del Corona Virus; los cuales permitieron el planteo de los principales mecanismos de acción de fármacos y Nanopartículas con funcionalidades específicas. En esta dirección se ha destacado la importancia de la Bioconjugación de moléculas y variables Nano-arquitecturas para la incorporación dentro de células y desarrollo de vacunas. Además, se ha tratado sobre el desarrollo de tratamientos combinados en base a diferentes estrategias aplicadas. En este mismo sentido, finalmente se han presentados diferentes estudios y desarrollos actualmente en progreso, relacionados con el diseño de Nanoarquitecturas funcionales o Multifuncionales, con potencial implicación en tratamientos a venir.

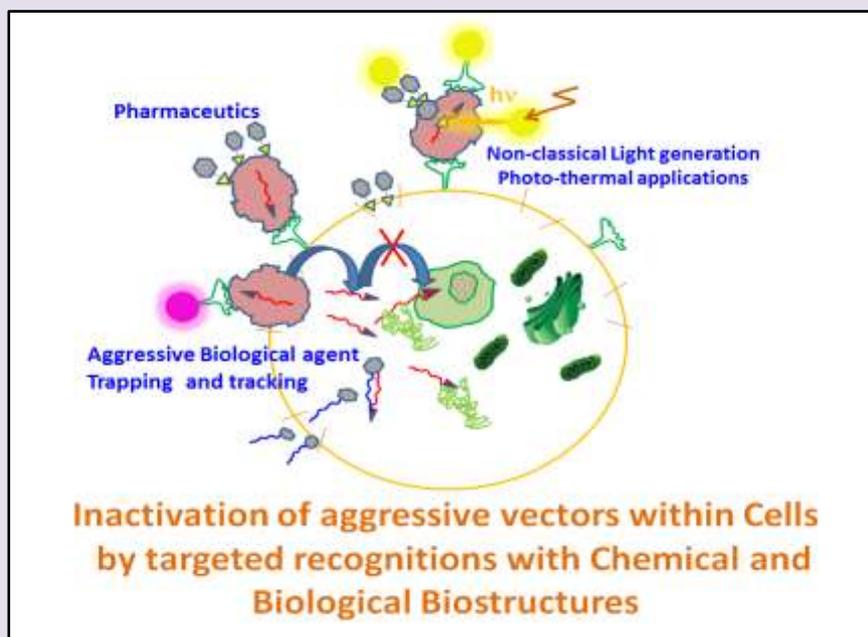
## Abstract

In this communication it was addressed different themes and topics implicated in the development of new treatments and vaccines applied to pathologies developed in humans such as by Virus. In this context, it was presented and discussed different strategies used, which were contemplated from the design of small molecules, towards higher sized chemical structures and new Nanoarchitectures. In particular, it was discussed varied studies developed for the Corona Virus treatment; which afforded to the main mechanisms of action of pharmacophores and targeted functional Nanoparticles. In this direction, it was highlighted the importance of Bioconjugation of molecules and variable Nanoarchitectures for their incorporation within cells and for the development of vaccines. Moreover, it was discussed about the development of combinatory treatments based on different applied strategies. In similar manner, finally it was presented different studies and developments actually in progress related with the design of functional and Multifunctional Nanoarchitectures with potential implications in future treatments.

Resumen Gráfico



Graphical Abstract



## 1. Introducción

La Nano-, y Biotecnología puede generar nuevas alternativas en diferentes aspectos para el desarrollo de nuevas terapias y generación de vacunas. En este sentido existen muchos desarrollos a ser realizados desde el diseño de moléculas pequeñas, hacia mayores dimensiones moleculares, contemplando Biomoléculas tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos naturales y sintético. Estas nuevas estructuras deben ser desarrolladas tanto como en condiciones completamente controladas al igual que en sistemas In Vitro e In Vivo; para luego pasar hacia otra escala de Bio-ensayos en búsqueda de realizar la evaluación del efecto deseado.

Estas apreciaciones de manera muy general intentan mostrar el complejo y multifactorial desafío a desarrollar. Sin embargo, es importante destacar que actualmente existen diferentes estrategias para el tratamiento de patologías producidas por agentes infecciosos Bioestructuras tales como virus. Es así que actualmente debido a la aparición del “Corona Virus” se han replanteado diferentes necesidades en variados aspectos para dar tratamiento al conocido SARS CoV-2. Por ejemplo, se debe considerar desde la interacción con los receptores de la proteína específica incorporada en el Corona Virus implicada en la adhesión en la membrana celular, y posterior introducción hacia el citoplasma, en donde se producen nuevas interacciones. En este sentido es necesario nuevos estudios relacionados en la detección de los mecanismos involucrados en cada una de las etapas mencionadas. De esta manera, se podría inferir más acerca de su proliferación tanto “In Vitro” e “In Vivo” en tiempo real. Así, nuevos fármacos o alternativos tratamientos combinatorios de diferentes drogas y sus respectivas estrategias podrían plantearse<sup>1</sup> en base a las etapas en el desarrollo de la enfermedad. Para comenzar el conocimiento de las principales estructuras químicas involucradas en la interacción, tal como la proteína específica del Corona Virus fue fundamental para el planteo de soluciones en la detección y tratamiento. Es allí, en donde se puede mencionar la importancia de la composición de amino-ácidos en base a la mutación del Virus, la cual produce modificaciones en las regiones alifáticas hidrofóbicas, estructuras aromáticas neutras, grupos sulfuros y tioles, grupos carboxilos e hidroxilos con variables propiedades hidrofílicas. Así, luego de la internalización, interacciones extras se desarrollan las cuales están presentes hasta la misma replicación del RNA. De esta manera en cada una de las etapas, surgen nuevas oportunidades para proponer nuevas estrategias desde un punto de vista de la Nanotecnología, Nanomedicina y Biotecnología. En este contexto, el desarrollo de nuevas vacunas y nuevos tratamientos alternativos cobran importancia<sup>2</sup>.

## 2. Estrategias para el diseño de vacunas y nuevos tratamientos en base al control de moléculas hacia la Nano-escala

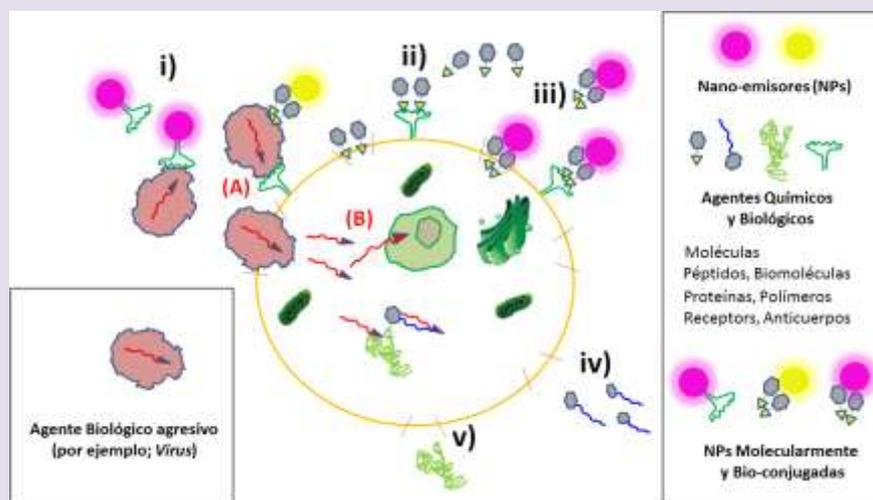
En este sentido se puede mencionar diferentes estrategias evaluadas para el desarrollo de nuevas vacunas y tratamientos de Coronavirus en diferentes niveles de avance de la enfermedad. Por ejemplo; i) utilización de anticuerpos con variados objetivos tales como desde la detección, separación, y liberación controlada de Fármacos; ii) administración de antígenos; iii) bloqueadores de receptores moleculares; iv) uso de partículas del tipo Virus no infectivos o inocuos; v) péptidos y proteínas con aplicaciones tales como agentes de Bioconjugación y desarrollo de vacunas; vi) estrategias basadas en material genético tal como vacunas en base a ácidos nucleicos; vii) desarrollo de vectores virales con respuestas inmunes como vacunas; y viii) otras estrategias combinatorias<sup>3</sup>. En todas las anteriores posibilidades igualmente deben tenerse en cuenta las variaciones intrínsecas de cada uno de los medios biológicos involucrados. En este contexto se debe resaltar el tiempo implementado en la generación de conocimiento

fundamental para luego poder desarrollar un estudio aplicado tales como los mencionados “In Vitro” e “In Vivo” de manera de comprender diferentes mecanismos involucrados y eficiencias de vacunas y tratamientos del COVID-19<sup>4</sup>.

En esta dirección, tal como para los Corona Virus, se encuentra un enorme trabajo de Investigación y desarrollo de Vacunas y nuevos tratamientos en diferentes fases de su aplicación. Se puede mencionar la evaluación de respuestas de anticuerpos neutralizantes mediante el diseño apropiado de estructuras de proteínas<sup>5</sup>; y RNA codificando el antígeno del S-2P de la proteína específica del Corona Virus<sup>6</sup>. Además, la posibilidad de la utilización de agentes químicos, nuevos Nanomateriales, y mezclas sintéticas de coadyuvantes<sup>7</sup> y aplicación de tratamientos combinados son tenidos también en cuenta<sup>8</sup>.

Aun así, luego del desarrollo de una vacuna es necesaria la evaluación de la misma en diferentes poblaciones debido a posibles rechazos en base a variaciones biológicas entre las mismas<sup>9</sup>. Y en esa dirección, aun si hay unas pocas vacunas desarrolladas ya aceptadas e incorporadas en el mercado, continua en discusión acerca de nuevas aplicaciones y nuevas estrategias para efectos más eficientes<sup>10, 11</sup>. Es por ello que durante el transcurso de la evolución biológica de la enfermedad permanece el desafío y necesidad de la evaluación continua de las estrategias propuestas al igual que la contemplación de modificaciones o mutaciones en el mecanismo de la enfermedad<sup>12-14</sup>.

Se pueden plantear nuevos tratamientos emulando mecanismos de acción ya conocidos al igual que proponer otros. En base a este conocimiento y mediante un acompañamiento de desarrollo y síntesis de nuevos agentes químicos, Nanoplateformas funcionales, y agentes Biológicos se puede plantear nuevas estrategias de acción controladas y direccionadas específicamente. Además; es importante mencionar que con el advenimiento de la Biotecnología nuevas estrategias basadas en sistemas Nano-Bio- híbridos podrían evaluarse para la incorporación en células (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos de acción de un potencial agente Biológico en una Célula o Micro-organismo Uni-celular; y aplicación de diferentes tratamientos en base a Moléculas, Biomoléculas, y Nanoplateformas Bio-conjugadas. Situación (A) contempla mecanismos superficiales y (B) dentro de la Célula. El agente Biológico contiene cargado vectores tóxicos (vector representado con línea curva roja y flecha azul). Los mecanismos de acción de fármacos, agentes Biológicos, y Nano-fármacos corresponden mediante la utilización de i) antígenos y anticuerpos unidos a Moléculas Orgánica Laser, y Nanopartículas Luminiscentes, ii) Moléculas con interacciones específicas, iii) Nanopartículas modificadas con Moléculas con interacciones específicas, iv) Biomoléculas sintéticas y naturales, v) Péptidos y proteínas. Reproducción by Bracamonte at al.@2021.

En las diferentes vías de incorporación de una determinada Bio-estructura patológica tal como los Virus, existen diferentes interacciones específicas las cuales deben ser consideradas para el diseño de un nuevo tratamiento o vacuna. Las mencionadas deben ser consideradas para dirigir el tratamiento de una manera específica. En este sentido se puede mencionar la Inmunomodulación contemplada para el tratamiento guiado por la Inmuno-patología de la infección del SARS-CoV-2<sup>15</sup>. De manera similar, se debe tener en cuenta para la aplicación de otras estrategias tal como para el bloqueo de sitios específicos implicados en el desarrollo de una infección<sup>16</sup>. De esta manera se puede dirigir el desarrollo e Investigación hacia el diseño y síntesis de nuevas estructuras químicas, Biomoléculas y Nanoarquitecturas. Es así que la Biodetección, diagnóstico y aplicación de nuevos tratamientos específicos puede ser considerado como una actividad constante y perenne de desarrollo e Investigación aplicada; en donde las Ciencias fundamental y Aplicada están muy cercanas y superpuestas.

### 3. Importancia de la Bioconjugación en la Nano-escala.

La bioconjugación implica la unión de una molécula a otra, generalmente a través de un enlace covalente, para crear un complejo formado por ambas moléculas unidas entre sí. En la mayoría de los casos, al menos una de las moléculas es de origen biológico o es un fragmento o derivado de una biomolécula.

La importancia de la bioconjugación radica en la capacidad de producir un material híbrido que reúne las propiedades y la funcionalidad únicas de ambos materiales<sup>17, 18</sup>. Asimismo, las excelentes propiedades que poseen las nanopartículas pueden potenciarse mediante la conjugación con biomoléculas, lo que permite el aprovechamiento de la especificidad natural del componente biológico, mientras que la NP proporciona una mayor estabilidad y con frecuencia mejora las propiedades biológicas de la biomolécula en comparación con su estado nativo. Debido a la amplia variedad de metodologías utilizadas para la conjugación de biomoléculas existen innumerables aplicaciones de los bioconjugados obtenidos<sup>19</sup>.

En los últimos años, tras el avance de las nuevas tecnologías, existe un creciente interés en el desarrollo de nanomateriales para aplicaciones biológicas. En este sentido, la nanomedicina se ha centrado en el desarrollo de vacunas, dispositivos de diagnóstico, sistemas de imágenes ultrafinas, dispositivos médicos invasivos y no invasivos, especialmente para el diagnóstico temprano para la detección y el tratamiento de numerosas enfermedades<sup>20</sup>.

Varios tipos de nanopartículas se han desarrollado para potenciales aplicaciones clínicas y biomédicas; como por ejemplo, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, sílice, nanopartículas de plata, nanopartículas de oro, puntos cuánticos, nanopartículas magnéticas, etc. Estas estructuras son frecuentemente utilizadas como plataformas para sistemas de administración de fármacos, ya que pueden bioconjugarse con fármacos y/o biomoléculas con el objetivo de mejorar la biocompatibilidad, la biodisponibilidad y la farmacocinética<sup>21</sup>.

Algunas vacunas conjugadas con proteínas ya han sido aprobadas para la inmunización masiva, como es el caso de las vacunas conjugadas contra la fiebre tifoidea (Typbar-TCV® y PedaTyphTM) que consisten en la bioconjugación de antígenos del polisacárido Vi y proteínas del toxoide tetánico<sup>22</sup>.

Una vacuna basada en bioconjugados ha entrado en ensayos clínicos de fase II en Cuba, en la cual Valdes-Balbin y col. conjugaron SARS-CoV-2 RBD (dominio de unión al receptor) con toxoide tetánico. Este bioconjugado indujo una potente respuesta inmune en animales de laboratorio<sup>23</sup>.

En este sentido, se espera que con los avances en nanotecnología, y a través del desarrollo de nano-vacunas conjugadas se logre una mayor eficacia y seguridad, respecto a las vacunas actuales, en la prevención y tratamiento de patologías.

#### 4. Conclusiones y perspectivas Futuras

En esta comunicación se discutió sobre los diferentes mecanismos involucrados para la evaluación de vacunas y nuevos tratamientos a enfermedades, tal como por ejemplo la generada por el Corona Virus. En ese sentido se destaca la participación de variadas estructuras químicas para interacciones específicas, al igual que anticuerpos y antígenos; y otras Biomoléculas tales como péptidos, RNA, y DNA, etc. También es importante mencionar el diseño y evaluación de Nanoestructuras Bio-conjugadas con una función específica o multi-funcionalidades dentro de las cuales se pueden contemplar, reconocimiento, bloque de sitios activos, incorporación dentro de células, detección, activación de sistemas de Nano-Fotónicos, liberación controlada de luz no-clásica, y de fármacos, entre otras. Además, en base al control desde la escala molecular hacia la Nano-, y Micro-escala se puede generar variados Nano-dispositivos, Micro-dispositivos con potenciales usos en Biofotónica y Nanomedicina<sup>24</sup>. En estas perspectivas, se pueden mencionar recientes publicaciones con alto interés, valor agregado, e interés científico y tecnológico tales como desarrollo de Micro-jeringas para la liberación de Nano-vacunas en base a ADN (Ácido Desoxirribonucleico) para combatir el COVID-19<sup>25</sup>. Además, a partir del concepto de Nano-plataformas Luminiscentes o con respuesta Ópticamente activa e Inteligente producidas para diagnóstico y tratamiento (conocidas del Idioma Inglés, como del tipo *Lab. On Particles*)<sup>26</sup>. Es así, que se puede mencionar el desarrollo de Moléculas Foto sensibilizadoras y Nanoestructuras afines para la generar respuestas de sistemas Nano-Ópticos altamente sensibles en sistemas Micro-, y Nano-fluídicos<sup>27, 28</sup>. Además, con la posibilidad de desarrollar estrategias para la destrucción de Bioestructuras tales como tumores<sup>29</sup>. Y en este contexto se debe destacar la importancia de la precisión y exactitud de los nuevos tratamiento debido a los posibles efectos colaterales, los cuales pueden llegar a problemas tan serios como a nivel Neurológico<sup>30</sup>. Y es allí, en donde se debe destacar la importancia e implicación de Investigación y desarrollo en Bioconjugación de Fármacos, Nano-fármacos, Nano-vacunas y nuevas Nanoplateformas Multi-funcionales.

#### Agradecimientos

En esta sección se agradece especialmente a todas las Subvenciones otorgadas para el desarrollo de Actividades de Investigación en las diferentes áreas involucradas discutidas en este artículo. Así, es importante mencionar a CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (National Research Council of Argentine), a la ANPCyT, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (National Agency of Scientific and Technology Promotion of Argentine); y especialmente a SECyT (Secretary of Science and Technology from the National University of Cordoba, UNC, Argentina) por el otorgamiento de la Subvención para jóvenes Investigadores al autor A. G. B. del INFIQC, FCQ, UNC, Argentina.

Además, se agradece al Profesor Denis Boudreau del "Département de chimie y Centre d'optique, photonique et laser (COPL)", Québec, Canada, por su contribución y trabajo en colaboración en progreso; al igual que por su apoyo en demandas de subvenciones relacionadas en curso. De igual manera, se agradece a la Profesora Valeria Ame del "Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias, Químicas, UNC", Argentina, por su colaboración en proyectos relacionados.

Por último, se agradece especialmente a la Profesora Daniela Quinteros del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas, de la UNC, junto a su Grupo de

trabajo compuesto por la estudiante de Doctorando Sofía Martínez, y la Dra. Cecilia Tettamanti, por el trabajo en colaboración relacionado con Bioconjugación de Nanopartículas.

### Bibliografía

- <sup>1</sup> M. Mousavi, L Tan Moriyama, C. Grecco, et al. Photodynamic therapy dosimetry using multiexcitation multiemission wavelength: toward real-time prediction of treatment outcome *J Biomed Opt*; 25, 6 (2020) 1-15.
- <sup>2</sup> Draz MS, Vasan A, Muthupandian A, et al. (2020) Virus detection using nanoparticles and deep neural network-enabled smartphone system. *Sci Adv*; 6(51): eabd5354:1-. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abd5354> PMID: 33328239.
- <sup>3</sup> Morse JS, Lalonde T, Xu S, Liu WR. (2020) Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *ChemBioChem*; 21(5): 730-8. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.202000047> PMID: 32022370.
- <sup>4</sup> Amanat F, Krammer F. (2020) SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report *Immunity*. *Cell press*; 52: pp. 583-588.
- <sup>5</sup> Callaway E. (2020) The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature*; 580(7805): 576-7. <http://dx.doi.org/10.1038/d41586-020-01221-y> PMID: 32346146.
- <sup>6</sup> Lipsitch M, Dean NE. (2020) Understanding COVID-19 vaccine efficacy. *Science*; 370(6518): 763-5. <http://dx.doi.org/10.1126/science.abe5938> PMID: 33087460.
- <sup>7</sup> Walls AC, Fiala B, Schäfer A, et al. (2020) Elicitation of Potent Neutralizing Antibody Responses by Designed Protein Nanoparticle Vaccines for SARS-CoV-2. *Cell*; 183(5): 1367-1382.e17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.043> PMID: 33160446.
- <sup>8</sup> Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, et al. (2020) An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report, *The New England Journal of Medicine*. *N Engl J Med*; : 1-12.
- <sup>9</sup> Ni Q, Zhang F, Liu Y, et al. (2020) A bi-adjuvant nanovaccine that potentiates immunogenicity of neoantigen for combination immunotherapy of colorectal cancer. *Sci Adv* 2020; 6(12): eaaw6071. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aaw6071> PMID: 32206706.
- <sup>10</sup> Cohen M S, Corey L. From the Editorial. Combination prevention for COVID-19 *Science*; 368(6491): 551-552.
- <sup>11</sup> Drysdale S B, Barr R S, Rollier C S, Green C A, Pollard A J, Sande C J. (2020) Priorities for developing respiratory syncytial virus vaccines in different target populations *Science Translational Medicine*; 12(535): 1-4. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aax2466>.
- <sup>12</sup> Mina MJ, Andersen KG. (2020) COVID-19 testing: One size does not fit all. *Science*. <http://dx.doi.org/10.1126/science.abe9187:1-3> PMID: 33414210.

- <sup>13</sup> Ball P. (2021) The lightning-fast quest for COVID vaccines - and what it means for other diseases. *Nature*; 589(7840): 16-8. <http://dx.doi.org/10.1038/d41586-020-03626-1> PMID: 33340018.
- <sup>14</sup> Das S, Das S, Ghangrekar MM. (2020) The COVID-19 pandemic: biological evolution, treatment options and consequences. *Innovative Infrastructure Solutions*; 5(76): 1-13.
- <sup>15</sup> M. J. Christie, A. T. Irving, S. C. Forster, B. J. Marsland, P. M. Hansbro, P. J. Hertzog, C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, Of bats and men: Immunomodulatory treatment options for COVID-19 guided by the immunopathology of SARS-CoV-2 infection, *Sci. Immunol.* 6, eabd0205 (2021) 1-10.
- <sup>16</sup> S. A. Rahman, B. Yagnik, A. P. Bally, K. N. Morrow, S. Wang, T. H. Vanderford, G. J. Freeman, R. Ahmed, R. Rao, Amara, PD-1 blockade and vaccination provide therapeutic benefit against SIV by inducing broad and functional CD8+ T cells in lymphoid tissue, *Sci. Immunology*, 6, 63 (2021) 1-10.
- <sup>17</sup> Elzahhar P., Belal A.S.F., Elamrawy F., Helal N.A., Nounou M.I. (2019) Bioconjugation in Drug Delivery: Practical Perspectives and Future Perceptions. In: Weissig V., Elbayoumi T. (eds) *Pharmaceutical Nanotechnology. Methods in Molecular Biology*, vol 2000. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9516-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9516-5_11).
- <sup>18</sup> Greg T. Hermanson, Chapter 1: Introduction to Bioconjugation. Editor(s): Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Academic Press, 2013, Pages 1-125, ISBN 780123822390, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00001-7>.
- <sup>19</sup> Iriarte-Mesa, C., López, Y.C., Matos-Peralta, Y. et al. Gold, Silver and Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Bionanoconjugation Strategies Aimed at Electrochemical Applications. *Top Curr Chem (Z)* 378, 12 (2020). <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0275-y>.
- <sup>20</sup> Greg T. Hermanson, Chapter 1: Introduction to Bioconjugation. Editor(s): Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Academic Press, 2013, Pages 1-125, ISBN 9780123822390, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00001-7>.
- <sup>21</sup> Long NV, Yang Y, Teranishi T, Thi CM, Cao Y, Nogami M. Biomedical Applications of Advanced Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015 Dec;15(12):10091-107. doi: 10.1166/jnn.2015.11691. PMID: 26682455.
- <sup>22</sup> Lu, L.; Duong, V.T.; Shalash, A.O.; Skwarczynski, M.; Toth, I. Chemical Conjugation Strategies for the Development of Protein-Based Subunit Nanovaccines. *Vaccines* 2021, 9, 563. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060563>.
- <sup>23</sup> Valdes-Balbin, Y., Santana-Mederos, D., Quintero, L., ...Garcia-Rivera, D., Verez Bencomo, V. SARS-CoV-2 RBD-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Induces a Strong Neutralizing Immunity in Preclinical Studies. *ACS Chem. Biol.* 2021, 16, 7, 1223–1233 Publication Date: July 4, 2021 <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00272>.

<sup>24</sup> Book entitled: “Frontiers in Nano- and Micro-device Design for Applied Nanophotonics, Biophotonics and Nanomedicine”, Chapters 1-15, authored Book by A.Guillermo Bracamonte, Bentham Science Publishers, ISBN: 978-1-68108-857-0 ©(2021) 1-200. DOI 10.2174/97816810885631210101 (<https://benthambooks.com/book/9781681088563/>).

<sup>25</sup> Y. Yin, W. Su, J. Zhang, W. Huang, X. Li, H. Ma, M. Tan, M. Tan, M. Tan, H. Song, G. Cao, S. Yu, D. Yu, J. Hoon Jeong, X. Zhao, H. Li, G. Nie, H. Wang, Separable Microneedle Patch to Protect and Deliver DNA Nanovaccines Against COVID-19, ACS Nano 2021, 15, 9, 14347–14359.

<sup>26</sup> Martin Ame, S. A. Serea, A. Shalan, A. G. Bracamonte, Detection of Viruses and Development of New Treatments: Insights into Antibody-Antigen Interactions and Multifunctional Lab-On-Particle for SARS CoV-2 , J Nanotechnol Nanomaterials, Scientific Archives (Creative Commons Attribution License), 2, 2 (2021) 67-75.

<sup>27</sup> C. Salinas, A. G. Bracamonte, From Microfluidics to Nanofluidics and signal Wave-guiding for Nanophotonics, Biophotonics resolution and Drug Delivery, Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research, 2 (2019) 1-6.

<sup>28</sup> Luna R. Gomez Palacios, Alicia Veglia, A. Guillermo Bracamonte, Inflow nano-optics from the near-to the far-field detection based on Metal-Enhanced Fluorescence signaling, Microchemical Journal, 169, 106539 (2021) 1-9.

<sup>29</sup> J. Guo, K. Feng, W. Wu, Y. Ruan, H. Liu, X. Han, G. Shao, X. Sun, Smart I-Labeled Self-Illuminating Photosensitizers for Deep Tumor Therapy, Angewandte Chemie International, 60, 40 (2021) 21884-21889. <https://doi.org/10.1002/anie.2021072>.

<sup>30</sup> T. L. Wiemken, J. Salas, D. F. Hoft, C. Jacobs, J. E. Morley, J. F. Scherrer, Dementia risk following influenza vaccination in a large veteran cohort, Vaccine, 39, 39 (2021) 5524-5531.

## Artículo de Revisión

### ***Degeneración Macular Asociada a la Edad: importancia del uso de modelos animales para el estudio de su patogénesis y potenciales agentes terapéuticos*** ***(Age-related macular degeneration: importance of the use of animals models for the study of its pathogenesis and potential therapeutic agents)***

***Por Bioq. Albana Tovo, Daniela I. Costantini (estudiante de Bioquímica), Dra. Paula V. Subirada y Dr. Pablo F. Barcelona***

***pbarcelona@unc.edu.ar***

***Integrantes del CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.***

#### **Resumen**

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una patología multifactorial donde se produce la degeneración de la macula, región de la retina de mayor densidad de fotorreceptores, la cual genera la pérdida de la visión central. La DMAE es una enfermedad crónica, que afecta mayoritariamente a adultos mayores de 65 años. Sus mecanismos patogénicos no son conocidos en su totalidad, por esa razón profundizar su estudio es fundamental para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. En este sentido, los animales de experimentación son una herramienta valiosa ya que nos ofrecen la posibilidad de estudiar múltiples procesos que se llevan a cabo durante esta patología. Entre las diversas especies actualmente utilizadas, se destacan ampliamente los roedores, aunque ninguna de ellas logra reproducir en su totalidad las etapas de la patología tal y como ocurre en los seres humanos. En esta revisión, intentaremos exponer las virtudes y limitaciones de los diferentes modelos animales disponibles en la actualidad, para mejorar el entendimiento de los mecanismos de la DMAE así como para aplicar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su prevención y tratamiento.

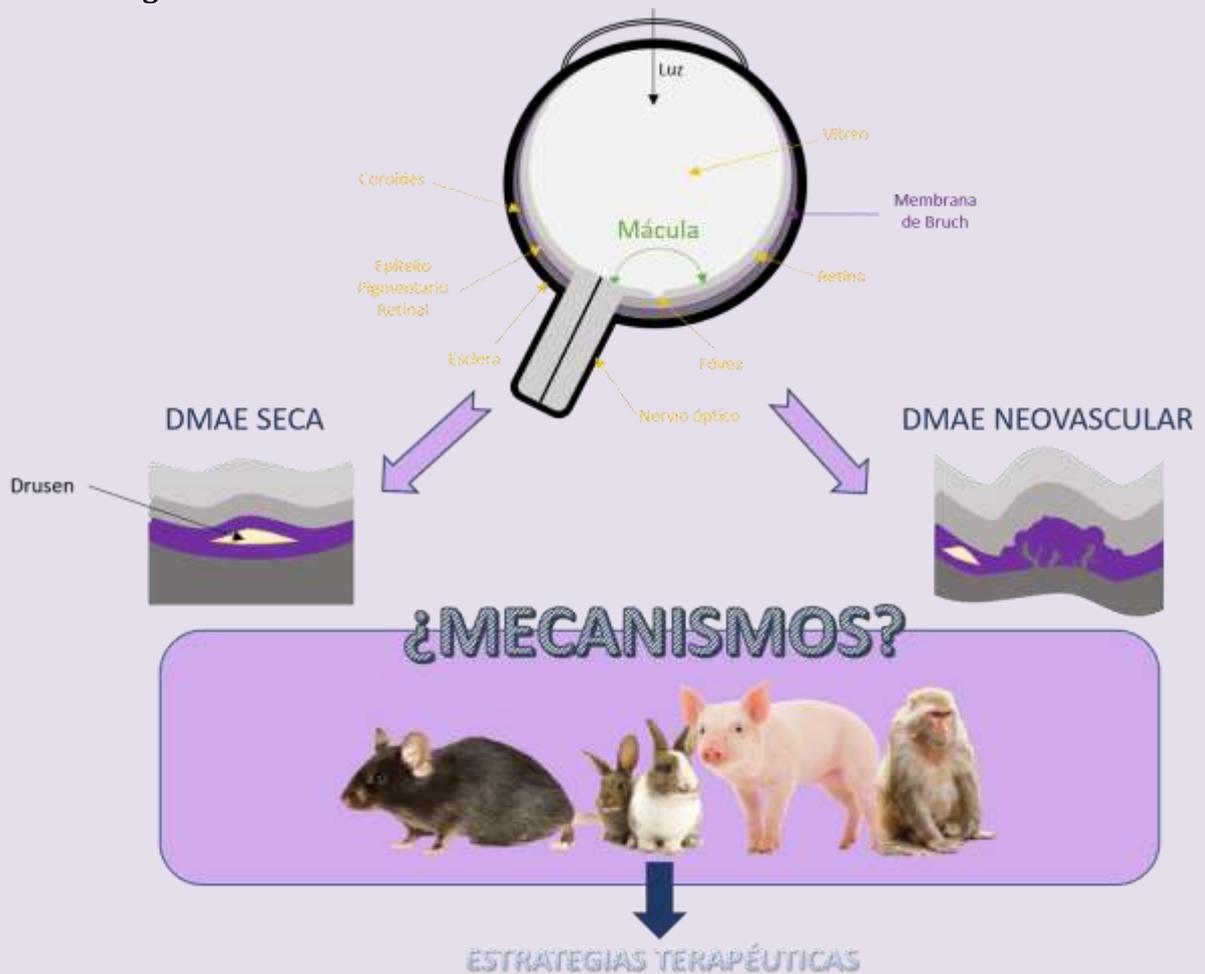
#### **Abstract**

Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial pathology where macula, high photoreceptor region of the retina, suffers a degeneration causing loss of central vision. AMD is a chronic disease that mainly affects adults over 65 years old. Its pathogenic mechanisms are unknown plenty, therefore it is important to deepen the study of its pathogenic mechanisms in order to develop new therapeutic agents. In this sense, experimental animals are a valuable tool since they offer us the possibility of studying multiple processes during the pathology. Among the various species currently used, rodents widely stand out, although none of them allow to fully reproduce the stages of the

pathology as it occurs in humans. In this review, we will try to expose the virtues and limitations of the different animal models available today, to improve the understanding of the mechanisms of AMD as well as their application in the development of new therapeutic strategies for its prevention and treatment.

**Palabras Claves** Degeneración macular asociada a la edad, Modelos Animales, Neovascularización, Coroides, Retina.

**Resumen gráfico**



## Introducción

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una afección progresiva que se manifiesta de manera gradual en un alto porcentaje en personas mayores de 50 años (1). Esta enfermedad constituye la principal causa de ceguera severa e irreversible en los países desarrollados, y la tercera en todo el mundo (2). En los próximos 20 años se espera un incremento mayor al 70% en la prevalencia de las enfermedades directamente relacionadas con el envejecimiento tal como es la DMAE (3,4).

La Macula es el área central de la retina donde la densidad de fotorreceptores es mayor, lo cual proporciona la agudeza visual que permite al ojo percibir detalles finos y pequeños (4). Esta región de la retina se especializa en la captación de las imágenes que ocupan el centro de nuestro campo visual, para luego ser transmitidas a través de las células ganglionares una señal eléctrica al cerebro (5).

La DMAE se la clasifica en DMAE seca y DMAE neovascular. En el primer caso, se produce la formación de depósitos de lípidos, proteínas y debris celulares denominados Drusen, en la interfaz del Epitelio Pigmentario Retinal (EPR) y la membrana de Bruch, lo cual induce un déficit en el aporte nutricional por parte del EPR hacia los fotorreceptores. En el segundo caso, se generan neovasos desde la vasculatura coroidea que invaden la retina mediante la ruptura de la membrana de Bruch y causan el desprendimiento de la retina con consecuente degeneración de fotorreceptores y déficit visual (6).

En la actualidad existen tres hipótesis acerca de su patogénesis. Una de ellas, la “teoría hemodinámica”, plantea que el depósito de lípidos en la esclera y en la membrana de Bruch induce un endurecimiento del tejido y particularmente de los vasos coroideos de manera similar a la aterosclerosis, disminuyendo el flujo sanguíneo y aumentando la presión de los coriocapilares, lo cual culmina con la Neovascularización Coroidea (NVC) (6). Otra, sostiene que hay una disfunción del EPR en la que el estrés oxidativo sumado a la activación del complemento, estimulan la síntesis de factores proinflamatorios y proangiogénicos (7). Finalmente, otra corriente de pensamiento hipotetiza que un estado inflamatorio crónico del microambiente ocular induce la activación células inflamatorias residentes y el reclutamiento de las células circulatorias, o promoviendo la síntesis y secreción de factores angiogénicos (8). Sin embargo, los mecanismos patogénicos exactos y la secuencia temporal en la que estos tienen lugar son aún desconocidos.

La relevancia del estudio de la DMAE radica en que esta es una patología crónica en la que los síntomas comienzan siendo leves o imperceptibles, hasta culminar con la pérdida de la visión sino se tratan a tiempo (4). Por tal motivo el uso de modelos animales que reproduzcan algunos los aspectos más importantes de la patología, proporciona una herramienta importante para la comprensión de los mecanismos bioquímicos, celulares y moleculares involucrados en la progresión de la patología, así como en el desarrollo de nuevos tratamientos.

## Modelos experimentales de DMAE

Como ya se mencionó, hay múltiples mecanismos moleculares y celulares que están involucrados y conocer más acerca de ellos favorecerá el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Con este objetivo, el uso de animales de experimentación constituye una herramienta clave para su investigación. Aunque hasta el momento aún no existe ningún

modelo que reproduzca la patología tal y como ocurre en los humanos, hay una amplia variedad de modelos que permiten evaluar diferentes aspectos por lo que la selección de cada una de ellos dependerá de sus virtudes y debilidades. Si bien, se han establecido modelos en primates, cerdos, conejos, ratas y ratones, los roedores son los más utilizados por su bajo costo de mantenimiento, facilidad de reproducir la patología parcialmente, pero en tiempos cortos sumado a la posibilidad de ser modificados genéticamente. Sin embargo, la principal desventaja anatómica de esta especie es que carece de mácula. A pesar de ello, se ha descrito que el área central de la retina de roedores posee una mayor concentración de bastones, un tipo de fotorreceptores (5). Por el contrario, los grandes animales tienen a su favor la cercanía genética con los humanos, pero los costos, manejo, manipulación genética y tiempo de desarrollo de la enfermedad hacen que su uso sea muy limitado.

Para el estudio de la DMAE seca hay una amplia variedad de modelos que se pueden utilizar dependiendo cuál sea el mecanismo que se desea investigar. Como se mencionó anteriormente, es una patología que tiene un fuerte componente inflamatorio (9). Se cree que el complemento podría tener implicancia en la formación de los depósitos de Drusen, por lo tanto, hay ratones transgénicos que sobreexpresan C3 así como ratones deficientes para los receptores de C3a y C5a entre otros. A su vez, para estudiar el rol de las quimiocinas y el reclutamiento de células mononucleares, se puede optar por ratones deficientes para CFH, CCL2, CCR2, CX3CR1. Por otro lado, factores externos tales como la dieta o el tabaquismo son fuentes de estrés oxidativo y también pueden desencadenar la DMAE. En relación a este último mecanismo, existen modelos de ratones con dietas ricas en glucosa y/o lípidos o ratones genéticamente modificados en los genes CTSD, CP o APOE, así como en marcadores de estrés oxidativo tales como SOD1 y SOD2 (10,11,12). Sin embargo, en la mayoría de estos modelos los ratones muestran cambios en la retina luego de 12-24 meses de edad, generando una dificultad experimental para evaluar distintos tratamientos. Existen otros modelos donde el daño retiniano se produce de forma aguda, inducidos por la inyección sistémica de yodato de sodio, un oxidante específico del EPR (13), o por una exposición prolongada a luz de alta intensidad (14) pero en este caso los cambios son muy diferentes de los cambios crónicos y progresivos que se encuentran en la DMAE humana. En estos últimos años se ha desarrollado un modelo que genera alteración del flujo sanguíneo coroideo mediante una por la remoción del ganglio cervical superior (15)

Respecto al estudio de DMAE neovascular, el modelo más utilizado es el denominado neovascularización coroidea inducida por láser de fotocoagulación (16), donde se realiza la inducción por daño térmico de un láser sobre el EPR que irrumpe la integridad de la membrana de Bruch. Este modelo permite evaluar el componente inflamatorio y neovascular a cortos tiempos 7-14 días y se puede realizar tanto en primates como en roedores (16). También existe un modelo quirúrgico de NVC en el que se inyecta Matrigel en el espacio subretinal, la cual es una sustancia rica en proteínas de la matriz extracelular y sustancias proangiogénicas que favorecen la neovascularización, este modelo puede ser aplicado en cerdos, conejos y también en roedores (17).

Es importante resaltar que los animales de experimentación, principalmente ratones, constituyen una herramienta fundamental e irremplazable para el estudio de las características de la DMAE. Destacando su facilidad de manipulación así como la

posibilidad de estudiar la gran cantidad de variables que participan en esta patología tan compleja en tiempos cortos. Es necesario continuar avanzando en el conocimiento de la patogénesis, para que el desarrollo de modelos más específicos y terapias novedosas sea posible.

### Referencias Bibliográficas

1. Gohel PS, Mandava N, Olson JL, Durairaj VD. Age-related macular degeneration: an update on treatment. (2008) *Am J Med.* 121(4):279-81.
2. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. (2004) *Bull World Health Organ.* 82(11):844-51.
3. Gohdes DM, Balamurugan A, Larsen BA, Maylahn C. Age-related eye diseases: an emerging challenge for public health professionals. (2005) *Prev Chronic Dis,* 2(3):A17.
4. Wong TY, Chakravarthy U, Klein R, Mitchell P, Zlateva G, Buggage R, Fahrback K, Probst C, Sledge I. The natural history and prognosis of neovascular age-related macular degeneration: a systematic review of the literature and meta-analysis. (2008) *Ophthalmology,* 115(1):116-26.
5. Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS. A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. (2015) *PLoS One,* 29;10(4):e0125631.
6. Katie L. Pennington and Margaret M. De Angelis. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. (2016) *Eye and vision,* 22;3:34.
7. Jayakrishna Ambati, Benjamin J. Fowler. Mechanisms of age-related macular degeneration. (2012) *Neuron.* 2012 Jul 12;75(1):26-39.
8. Michelle Grunin, Shira-Hagbi-Levi, Batya Rinsky, Yoav Smith, Itay Chowers. Transcriptome Analysis on Monocytes from Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. (2016) *Sci Rep* 4;6:29046.
9. Kumar-Singh R. The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD. (2019) *Exp Eye Res.* 184:266-277.
10. Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, Mills SA, Waugh M, Ho T, de Jongh RU, Phipps JA, Vessey KA. Studying age-related macular degeneration using animal models. (2014) *Optom Vis Sci.* 91(8):878-86. Review.
11. Mark E Pennesi, Martha Neuringer, Robert J Courtney. Animal models of age related macular degeneration. (2012) *Mol Aspects Med.*;33(4):487-509.

12. Hema L Ramkumar, Jun Zhang, Chi-Chao Chan. Retinal ultra structure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). (2010) Prog Retin Eye Res;29(3):169-90.
13. Carido, M., Zhu, Y., Postel, K., Benkner, B., Cimalla, P., Karl, M. O., Kurth, T., Paquet-Durand, F., Koch, E., Münch, T. A. et al. Characterization of a mouse model with complete RPE loss and its use for RPE cell transplantation.(2014). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 55, 5431-5444.
14. Bordone, M. P., Lanzani, M. F., López-Costa, J. J., Chianelli, M. S., Franco, P., Sáenz, D. A. and Rosenstein, R. E. Bacterial lipopolysaccharide protects the retina from light-induced damage.(2012). J. Neurochem. 122, 392-403.
15. Vincent Lambert , Julie Lecomte, Sylvain Hansen, Silvia Blacher, Maria-Luz Alvarez Gonzalez, Ingrid Struman, Nor Eddine Sounni, Eric Rozet, Pascal de Tullio, Jean Michel Foidart, Jean-Marie Rakic, Agnès Noel. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. (2013)Nat. Protoc. 8, 2197–2211.
16. Liu T , Hui L, Wang Y, Guo J, Li R, Su J, Chen J, Xin X, Li W (2013) In-vivo investigation of laser-induced choroidal neovascularization in rat using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 251:1293–1301
17. Cao J, Zhao L, Li Y, Liu Y, Xiao W, Song Y, Luo L, Huang D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Wen R. A (2010). A subretinal matrigel rat choroidal neovascularization (CNV) model and inhibition of CNV and associated inflammation and fibrosis by VEGF trap. Invest Ophthalmol Vis Sci.;51(11):6009-17.

## Artículo de Divulgación

### **Nuevas estrategias para la recuperación de fibras nerviosas lesionadas**

**Por Dra. Marta Lapid Volosin**

*Trasplantes de microglia o de células de médula ósea y novedosos mecanismos para estimular la formación de mielina promueven la recuperación de axones dañados.*

Los déficits funcionales ocasionados por lesiones del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) se deben principalmente a la interrupción de las conexiones axonales.

Traumatismos, infecciones, bloqueo del aporte sanguíneo y compresión por fractura ósea o tumores son las causas principales de las lesiones de las fibras nerviosas. Como consecuencia la zona inervada pierde funcionalidad, por ejemplo, los músculos se debilitan o paralizan, la sensibilidad es anormal o hay dolor. En la actualidad los tratamientos consisten en aliviar los síntomas y establecer compensaciones o reeducaciones neurológicas diversas.

Restaurar la función perdida con nuevas y originales estrategias terapéuticas es uno de los principales desafíos de la neurociencia contemporánea.

#### **En la frontera de la investigación**

Cuando se produce el corte parcial o total de una fibra nerviosa, es decir se cortan los axones, se interrumpe la conducción nerviosa y si estos no se reparan ocurre la muerte gradual de las neuronas.

El Dr. Zhigang He (Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA) y sus colaboradores estudian en roedores los mecanismos celulares y moleculares de la regeneración y recuperación de axones lesionados por compresión o *crush* del tracto corticoespinal y del nervio óptico, dos vías del SNC.

#### **Neonatos vs adultos**

Los axones del tracto corticoespinal nacen de neuronas localizadas en la corteza cerebral y se dirigen hacia la médula espinal. Estas fibras están vinculadas a movimientos voluntarios especializados de las extremidades y el tronco. Cuando sus conexiones axonales se interrumpen, se produce por debajo de la lesión, debilidad muscular total (plejía) o parcial (paresia) y torpeza de los movimientos finos del lado del cuerpo donde ocurrió el daño medular.

En neonatos las neuronas del SNC mantienen una fuerte capacidad de crecimiento lo que genera un ambiente permisivo para la reparación y regeneración de axones

lesionados. Por el contrario, en mamíferos adultos la médula espinal dañada forma una cicatriz que consiste en varios tipos de células gliales y no se produce regeneración espontánea del axón.

Para He y sus colaboradores esta diferencia era un desafío a resolver. Conocer cómo la médula espinal del neonato respondía a una lesión y organizaba su cicatrización podía dar solución a la limitación en el adulto.

Una de las características de la cicatrización es la acumulación de diversas células gliales que colaboran con el proceso de curación, entre ellas la microglía, las células inmunitarias residentes permanentes del SNC. Estas células son las encargadas de eliminar desechos tóxicos y, además, proporcionan un andamiaje para ciertos aspectos del desarrollo neural y para la recuperación de una lesión.

El *crush* de la médula espinal en ratones neonatos induce una curación sin cicatrices mediada por la microglía, lo que facilita el crecimiento de los axones de proyección larga a través de la lesión (Yi et al. Nature, 2020),

Mediante la técnica de secuenciación de ARN unicelular (scRNA-Seq), que proporciona el perfil transcripcional de miles de células individuales, se analizaron, en una muestra heterogénea de células, qué genes se expresan, en qué cantidades y cómo se diferencian a nivel de una sola célula. Con esta metodología se encontró que la activación de la microglía en neonatos es transitoria y tiene al menos dos funciones claves para lograr la reparación libre de cicatrices: una secreción inicial de fibronectina, una proteína de adhesión que permite la formación de puentes de unión entre los extremos cortados de los axones y la liberación consecuente de moléculas inhibitoras que favorecen la resolución de la inflamación.

Un trasplante de microglía neonatal en el área lesionada de ratones adultos logró restablecer las conexiones y mejorar la reparación y regeneración de los axones, lo que confirmó la importancia de estos hallazgos.

### **La mielina y el nervio óptico**

La mayoría de los axones del sistema nervioso están rodeados de una vaina de mielina, una combinación de proteínas y sustancias grasas que funciona como una capa aislante. La vaina de mielina permite que los impulsos eléctricos se transmitan de manera rápida y eficiente a lo largo del axón. En el cerebro y en la médula espinal la mielina la producen células gliales específicas: los oligodendrocitos.

Los axones mielinizados del nervio óptico, que se ubica en la parte posterior del ojo, son un modelo óptimo para estudiar los mecanismos que controlan la mielinización. Estos axones transportan impulsos nerviosos sensoriales desde neuronas de la retina hacia los centros visuales del cerebro. Si se dañan puede provocar disminución de la visión o incluso ceguera.

Aunque son múltiples las estrategias conocidas que promueven el crecimiento robusto de los axones del nervio óptico después de una lesión, estos axones

regenerados permanecen amielínicos por mecanismos aún desconocidos. El equipo de He (Wang at al. Neuron, 2020) examinó los posibles mecanismos que regulan este proceso.

### **Un tratamiento combinado**

Los receptores GPR17 son moduladores de la mielinización en el SNC, como sensores del daño local de la vaina de mielina desempeñan un papel en la reconstrucción y reparación de las áreas desmielinizadas por procesos inflamatorios en curso.

En condiciones fisiológicas, los receptores GPR17 presentes en las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, por sus siglas en inglés) son los responsables de su diferenciación y posterior maduración. Por el contrario, cuando se dañan las neuronas el número de estos receptores aumenta y se convierten en mediadores de los procesos desmielinizantes.

En el modelo del nervio óptico lesionado, He y su equipo mostraron que las OPCs experimentan una proliferación transitoria pero no se diferencian en oligodendrocitos maduros competentes para la mielinización. Esto se debe a dos mecanismos bien definidos: el bloqueo de la primera etapa de la diferenciación de las OPCs por una serie de señales intrínsecas de los receptores GPR17 y la interferencia causada por la activación sostenida de la microglía que impide su maduración a oligodendrocitos capaces de mielinizar.

El siguiente paso fue bloquear el efecto de los GPR17 con varios compuestos, entre ellos Montelukast, un antiinflamatorio que se utiliza en el tratamiento del asma y las alergias estacionales. Aunque esta droga resultó ser efectiva, solo un 15% de los axones pudieron ser remielinizados. Este porcentaje se elevó al 60% al combinar Montelukast con PLX3397, un compuesto que remueve la microglía de la zona dañada. Es decir, que con la co-manipulación de factores intrínsecos (GPR17) y extrínsecos (microglía) se logró una mielinización robusta de los axones regenerados.

Estos mecanismos reguladores dependientes del estadio de diferenciación de las OPCs serían una excelente estrategia para abordar una eficiente mielinización de novo en lesiones del SNC, que incluso podrían extrapolarse a otras enfermedades como la esclerosis múltiple que en su estado más avanzado desarrolla fallas en el proceso de formación de mielina.

### **Últimos hallazgos**

Los hallazgos de sus últimos estudios llevaron a He a proponer que para lograr la reparación y regeneración completa se necesita combinar ambas estrategias: “Es necesario conseguir el control temporal de la microglía activada – como en el neonato – para retornar a un estado homeostático rápido y espontáneo, crucial para un proceso de reparación libre de cicatriz y, es fundamental abordar los múltiples pasos y mecanismos regulatorios necesarios para lograr una (re) mielinización eficiente”, afirma He.

Puesto que una regeneración exitosa de los axones no conduce en forma directa a la recuperación de la funcionalidad, es crítico aumentar la capacidad intrínseca de crecimiento y mejorar el entorno alrededor de los sitios de lesión. “En efecto, comenta He, en estudios previos demostramos que los axones regenerados son capaces de formar contactos sinápticos funcionales pero sin una recuperación completa de la función. Considerando la capacidad plástica del SNC, soy optimista que estos hallazgos son un gran aporte para conseguirlo”.

Un escenario similar es el de los bebés recién nacidos que tienen conexiones neurales casi completas, pero que aun así tardan algún tiempo en poder caminar y hablar. Para He la mielinización es uno de los factores que permiten que los bebés caminen / hablen y que los animales neonatos lesionados se recuperen. Fue contundente al afirmar: “Para el desempeño conductual, es clave coordinar diferentes partes del SNC y esto es particularmente importante para los adultos que tenemos cerebro grande y médula espinal larga”.

La pregunta que ronda apunta al entrenamiento de rehabilitación como terapia crucial para revertir los efectos de la lesión. “Cada una de estas estrategias por sí sola puede no dar lugar a la recuperación, porque esto probablemente requiere muchos *cableados* diferentes (como conexiones de axones y mielinización) y software (programas de aprendizaje), solo espero poder tener pronto respuestas concluyentes para estas preguntas”, finaliza.

*El dialogo con el Dr. He se dio en el marco de la reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (Octubre, 2020) donde el Dr. He dictó una de conferencia plenaria.*

### **Otra mirada desde Argentina**

Al igual que en el laboratorio del Dr. He, en el Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB, UBA-CONICET, Argentina) la Dra. Patricia Setton-Avrúj y su equipo buscan estrategias para promover la remielinización y la regeneración morfológica y funcional en modelos experimentales de degeneración por trauma del SNP.

Las células mononucleares de médula ósea (BMMC por sus siglas en inglés) constituyen una población heterogénea con potencial para promover la regeneración de tejidos. Con elegantes experimentos (Piñero et al. Transgenic Res, 2018), Setton y su equipo demostraron que las BMMC, de forma espontánea o después de ser trasplantadas, migran de modo exclusivo hacia el lado del nervio lesionado y se localizan en la cercanía de los axones y de las células de Schwann, formadoras de mielina en el SNP.

Con esta información se propusieron evaluar el impacto sobre la regeneración, recuperación de la función nerviosa y modulación del dolor de un trasplante sistémico de BMMC en un modelo por compresión del nervio ciático. La lesión de este nervio del SNP, que se origina en la zona inferior de la columna y se extiende hacia las extremidades, puede producir la pérdida total o parcial de la función motora y sensitiva del miembro afectado y causar inflamación y dolor.

El estudio (Usach et al. Transplantation, 2017) se realizó en ratas adultas a las que se les administró, por la arteria caudal, BMMC autólogas aisladas inmediatamente después de la lesión del nervio. A diferentes tiempos de supervivencia, se realizaron análisis histológicos, inmunohistoquímicos, bioquímicos y conductuales que mostraron la eficiencia del trasplante para corregir alteraciones morfológicas y funcionales que resultan de la lesión y evitar la aparición del dolor neuropático. Además, las BMMC fueron excelentes reguladoras de la respuesta inmune, con la ventaja que pueden transdiferenciarse a las células residentes del tejido dañado y reemplazar las que mueren como consecuencia del proceso degenerativo.

El alto potencial de las células para la regeneración se debe a dos factores claves: liberan factores tróficos y modulan la respuesta inmune que se asocia a la inflamación producida por la lesión. Aunque los mecanismos específicos que subyacen a los efectos beneficiosos de las BMMC en el nervio expuesto a la lesión no se conocen aun, este tipo de trasplantes se están utilizando en ensayos clínicos para el tratamiento de cardiopatías, traumas cerebrales o accidentes cerebrovasculares.

Los resultados estimulan a avanzar en la evaluación de terapias regenerativas con células multipotentes adultas que tienen entre sus ventajas su baja inmunogenicidad y la facilidad de acceso para su administración por maniobra no invasiva de células provenientes del mismo paciente, cuyo uso no tiene cuestionamientos éticos.

### **Mirada a futuro**

¿Cómo encuentran los axones en regeneración las rutas correctas para formar sinapsis y así lograr sus objetivos funcionales? ¿En qué medida podría restaurarse la recuperación funcional mediante estos enfoques basados en la regeneración? ¿Podrían otras estrategias, como el entrenamiento para tareas específicas, mejorar la recuperación funcional después de una lesión? ¿Cuál es el alcance de las células madres adultas para restablecer circuitos neuronales dañados en el SNC y con ello eliminar los síntomas de una enfermedad? Estas son algunas de las preguntas cuyas respuestas establecerán importantes principios para que la medicina regenerativa ayude en la protección o regeneración de tejidos u órganos dañados.

## Referencias

Yi L, He X, Kawaguchi R, Zhang Y, Wang Q, Monavarfeshani A, Yang Z, Chen B, Shi Z, Meng H, Zhou S, Zhu J, Jacobi A, Swarup V, Popovich PG, Geschwind DH, **Zhigang He**, 2020, Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice, *Nature* 587, 613-618.

Wang J, He X, Meng H, Li Y, Dmitriev P, Tian F, Page JC, Q. Lu QR, **Zhigang He**, 2020, Robust Myelination of Regenerated Axons Induced by Combined Manipulations of GPR17 and Microglia, *Neuron* 108: 1-11.

Piñero G, Usach V, Soto PA, Monje PV, Setton-Avruj P, 2018, EGFP transgene: a useful tool to track transplanted bone marrow mononuclear cell contribution to peripheral remyelination, *Transgenic Res* 27, 135:153.

Usach V, Malet M, López M, Lavalle L, Piñero G, Saccoliti M, Cueto A, Brumovsky P, Brusco A, Setton-Avruj P, 2017, Systemic Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Promotes Axonal Regeneration and Analgesia in a Model of Wallerian Degeneration. *Transplantation* 101(7):1573-1586.