

SELECCIÓN DE ESCRITOS SOBRE HISTOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA E  
INMUNOLOGÍA

*Dr. Ángel Alonso*  
*Académico Titular*

SERIE CONTRIBUCIONES COMPILADAS N°3



ANCBA 2020

Alonso, Angel

Selección de escritos sobre histología, microbiología e inmunología / Angel Alonso ; compilado por Angel Alonso. - 1a edición especial - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires, 2020.

Libro digital, PDF/A

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-987-537-163-7

1. Medicina. I. Alonso, Angel, comp. II. Título.  
CDD 610

Fecha de catalogación: 8/2020

Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires  
Av. Alvear 1711, 3º piso – 1014 Ciudad de Buenos Aires – Argentina

**El presente trabajo se encuentra disponible sólo en versión electrónica**

[www.ciencias.org.ar](http://www.ciencias.org.ar)

correo-e: [info@ciencias.org.ar](mailto:info@ciencias.org.ar)

La publicación de los trabajos de los Académicos y disertantes invitados se realiza bajo el principio de libertad académica y no implica ningún grado de adhesión por parte de otros miembros de la Academia, ni de ésta como entidad colectiva, a las ideas o puntos de vista de los autores.

ISBN 978-987-537-163-7

## INDICE DE LOS ARTÍCULOS DEL VOLUMEN

1. La añosa juventud del timo	4
2. Anticuerpos y citoquinas en la inmunoterapia con bipolaris	26
3. Efecto Crónico del Material Particulado Aéreo de la Ciudad de Buenos Aires	27
4. La epigenética y la alergia: papel de la inmunoterapia específica	37
5. Fungal hypersensitivity in nasal pathologies	67
6. Alergia a los himenópteros : etiología, diagnóstico y tratamiento	78
7. Ige Antibodies Against the hbsag in humans	96
8. Introducción a la Oncoinmunopatología	102
9. Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos con Bipolaris australiensis	160
10. Neumonitis experimental en cobayos por hipersensibilidad a las proteínas del tabaco	165
11. Inducción de Orquitis autoinmune en cobayos	166
12. Micetismos. (parte 3): Síndromes tempranos gastrointestinales	196
13. Micetismos. (parte 4) : Síndromes tempranos con síntomas complejos	232
14. Polutantes ambientales no convencionales. Papel de las proteasas de la cucaracha periplaneta americana y del reduviedo triatoma infestans.	275
15. Micetismos. (parte 1): Síndromes con período de latencia tardía	314
16. La importancia biológica de los Receptores Toll	358
17. Receptores de la Inmunidad Connatural	372
18. Release of il- 4 from atopic and non-atopic lymphocytes stimulated by a bat allergen.	449
19. Utilidad de los peptidos 33 y 38 del polen de la graminea Lolium perenne en la inmunoterapia de la polinosis	455
20. Utilidad del VIC en la valoración de la funcionalidad de los linfocitos T	456
21. Inmuno-Biología del Triatoma Infestans (Vinchuca)	461

## LA AÑOSA JUVENTUD DEL TIMO

Angel Alonso, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico, Santiago R. Rodríguez.

Div. Alergia & Inmunología, -Hospital de Clínicas, -UBA, -SCA, -ANCBA.

**Resumen:** Se presentan datos sobre la utilidad de proteínas extraídas de timos humanos y de animales sobre la producción linfocitaria de IL-4 e IFN-gamma en cultivos celulares de atópicos y no-atópicos.

**Palabras clave:** timoestimulinas; IL-4; IFN-gamma; cultivos celulares.

**Summary:** The usefulness of thymic hormones is exposed in cell cultures of atopic and non-atopic lymphocytes detecting the production of IL-4 and IFN-gamma.

**Key words:** thymic hormones; IL-4; IFN-gamma; lymphocytic cultures.

### INTRODUCCION

Los griegos tuvieron 2 voces para significar el alma o la mente con igual énfasis (“psiqué” y “timós”) tratando de desentrañar con especial empeño cual era el asiento misterioso de la anatomía del alma. En esos intentos no faltaron quienes atribuyeron al corazón y a la aorta ese refugio inmanente. Otros, al observar un pequeño órgano cercano (el timo), pensaron que él era el responsable de tan ansiada búsqueda. Aunque timo proviene del griego thymos sus raíces son aún más profundas. Si nos remontamos más allá del mundo de Sócrates y de Platón, vemos que thymos procede de la raíz indoeuropea dheu, que forma parte de muchos derivados, cuyo significado es “elevarse en llamas”, “elevarse en forma de nube”, “hacer humo”, y en sánscrito la palabra dhuma de la que proceden tanto “humo” como “perfume”.

Según Julián Jaynes, thymos o thumos, fue con otros 6 términos traducidos como mente, espíritu o alma, ingrediente clave de la conciencia homérica. Significaba movimiento o actividad, tal como se perciben externamente.

Esta tensión o estrés provocó cambios físicos, un aumento de la adrenalina segregada, una taquicardia, y por ello una “agitación en el pecho”. De allí el thymos era una especie de fuerza o vigor; el hombre le hablaba al thymos, y viceversa, le dotaba de fuerzas para guerrear y le instaba al amor y a la victoria.

Quizás Ajax no estuviese deseoso de combatir, pero su thymos sí y no era Eneas sino su thymos quien se regocijaba en la victoria.

En la Ilíada, Aquiles dice “Despertándose como humo en los pechos de los hombres incluso cuando Agamenón me provocaba; pero olvidemos el pasado y aplaquemos al thymos en nuestros pechos”. Metafóricamente se aprecia el empleo de la palabra thymos y sus raíces indoeuropeas.

En el siglo II, Galeno dio el nombre de thymos al órgano formado por 2 lóbulos de color gris rosado que recordaba a un manojito de tomillo. Curiosamente a esta planta se la quemaba en el altar de los dioses a manera de incienso. Thymos significaba humo ascendente, incienso quemado en sacrificio a los dioses, en el thymele o altar y en el thymiaterion o incensario.

Este ritual equivalía a elevación, cantos de alabanza, espíritu y demostraciones de amor siendo identificado con el hálito o alma de donde dependían la energía y el valor de los hombres.

Por su parte, él sostenía que el timo servía como almohadilla para proteger a los grandes vasos contra eventuales traumatismos.

Sin embargo, luego se reconoció su naturaleza linfoidea, y en 1777 Hewson lo describió como el



centro de dicha actividad observando que el timo existe durante el curso de los primeros períodos de la vida precisamente cuando las células del tipo linfoideo aparecen y juegan un papel importante en la sobrevivencia del individuo.

Beard en 1900, sugirió que, por lo menos desde el punto de vista embriológico, el timo estaba relacionado íntimamente con el sistema linfático (hoy en día también es asociado con el sistema nervioso central) señalando “La suerte ha querido que haya caído en la cuenta de que los primeros leucocitos (en realidad linfocitos) provienen del timo a partir de sus células epiteliales, y de que el timo debe ser considerado como el punto de partida de todas las estructuras linfáticas del organismo”.

Más adelante, en 1935, Gregorie realizó la timectomía a humanos y permitió sostener esta argumentación habida cuenta de que no se producían cambios que pusieran en peligro la vida aunque en el hombre se observara una ligera linfopenia que no se vinculaba con ninguna otra patología.

En la década del 40, cuando aún no se había descubierto el porqué de la transmisión genética de los caracteres hereditarios, los bioquímicos llamaron “ácido timonucleico”, al que más tarde bautizarían como ácido desoxirribonucleico (ADN), cuyo nombre se debió al hallazgo de esta sustancia en gran cantidad en el timo de los terneros, y, llamaron timidina al nucleósido que se forma de la combinación de una nueva base pirimidínica aislada : la timina y la desoxirribosa.

Hoy es claro el porqué del alto contenido de ADN del timo fetal o infantil. Los timocitos o linfocitos que pueblan el timo están entre las células de núcleo más grande y, por ello, muy ricos en ADN. Sin embargo, las experiencias de Glick, Claman y Talmage (1963) al someter a animales adultos a la timectomía, y luego a la inyección de bacterias, otros antígenos particulados e injertos de tejidos de otros animales, lograron demostrar que la ablación del órgano producía ciertos cambios desfavorables en la respuesta inmune, sobre todo en la capacidad de sintetizar anticuerpos específicos, y en el rechazo de tejidos ajenos.

Si bien estas experiencias conmovieron el saber de entonces, había pasado inadvertido el hecho descrito por McEndy, Boon y Furth (1944), que habían señalado que la timectomía prevenía el desarrollo de la leucemia linfoidea en familias consanguíneas de ratones, que, espontáneamente desarrollaban la enfermedad al llegar los animales a cierta edad.

En su libro clásico de 1969, “Timo, Inmunización y Alergia”, el Dr. Plutarco Naranjo, Profesor de Inmunología de la Facultad de Medicina de Ecuador, nos manifestó en su visita al Centro de Alergia del Hospital de Clínicas de Buenos Aires (UBA), la importancia del timo aún en la edad adulta en contraposición con otros autores que desestimaban su valor en la senectud. Miller en 1966 sostuvo que “el timo no deja de existir durante el resto de la vida...” Stoner (1963), Clark (1966), Hoshino (1966) y Weiss (1963), señalaron que con la microscopía electrónica de la época, las células epiteliales tímicas conservaban cierta viabilidad independientemente de la edad de la muestra analizada. Esto entusiasmó a Miller (1961 a 1966) a iniciar una serie de timectomías neonatales que le permitieron esclarecer ciertas funciones tempranas del timo. Conjuntamente con Gaburro y Golpato establecieron una serie de graves alteraciones que ocasionaba la extirpación precoz del órgano sintetizándolas en : 1) sobre el crecimiento; 2) sobre los órganos linfáticos; 3) sobre los linfocitos; 4) sobre la respuesta inmune en sí misma; 5) sobre la supervivencia y 6) sobre el metabolismo.

En los animales se describen la “wasting disease” (síndrome caquético) y la “runt disease” (envejecimiento prematuro y muerte) como consecuencia de la timectomía neonatal. Hoy en día nadie duda que la aplasia o hipoplasia del órgano en el ser humano (similar a una timectomía neonatal) produce una grave deficiencia en la funcionalidad T llamada síndrome de Di George, que no es una enfermedad genética ni existe un patrón hereditario pues es una alteración del desarrollo embrionario durante las 8-a 12 semanas de gestación de la 3ª y 4ª bolsas faríngeas,

que también dan origen a las paratiroides, a la tiroides, al arco aórtico, y por extensión al tubérculo del oído y el filtrum labial.

Se discute su origen viral, tóxico (etilismo materno) o farmacológico sin precisión. Puede ser parcial (la más común) o completa y presenta ausencia de la sombra tímica en la radiografía del tórax del niño. El trasplante de timo fetal de menos de 14 semanas de gestación es una buena opción, pero debe realizarse lo antes posible. Su recuperación es notable en aquellos infectados con virus, hongos o parásitos, aunque el peor problema es la hipocalcemia y la cardiopatía.

Las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada suelen estar ausentes aunque ello es difícil de valorar en la corta edad, y los trasplantes, en general, son bien aceptados por la falla del sector LT.

### **ASPECTOS ACTUALES.**

En un meduloso estudio histopatológico del timo a distintas edades, un grupo de investigadores argentinos de la U.N.N.E. (Dres. María L. Piuizzi y A. Cerdera Noguera) realizaron la caracterización citológica de timos entre el nacimiento y los 5 años, entre los 5 y los 10 años, y en los adultos. Los órganos fijados en formol, se colorearon con hematoxilina-eosina para una primera observación sobre su estructura, conservación y viabilidad. A los buenos ejemplares se los sometió a técnicas de inmunoperoxidasa empleando como sistema de detección el de avidina-biotina y como revelador la diaminobencidina. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: el anti-CD45RO, marcador de timocitos; el CD68, marcador de histiocitos; el CK o marcador de citoqueratinas en células epiteliales; el S-100 o marcador de células retículo-epiteliales e histiocitos, y, el ACL o antígeno leucocitario común.

Los resultados se describen de la siguiente manera: en el grupo de **0 a 5 años**, con hematoxilina-eosina, se observó una delgada cápsula de tejido conectivo con numerosas trabéculas y una abundante población de timocitos en diferentes estadios de proliferación. Se advierte una distinción entre las zonas cortical y medular. Hay células retículo-epiteliales de aspecto normal con corpúsculos de Hassall conservados, y unos pocos pseudoquísticos. Estos hallazgos son coincidentes con los nuestros publicados oportunamente. La inmunomarcación reveló positividad con el monoclonal CK en las células retículo-epiteliales y en los Hassall ; con ACL y CD45RO en los timocitos presentes ; con CD68 y S-100 en los histiocitos y en las células retículo-epiteliales interdigitadas.

En niños **de 10 años**, con hematoxilina-eosina se observa que el timo presenta una estructura conservada destacándose la corteza sobre la médula y células linfocitarias proliferantes. En la primera, se visualizan células reticulares de los tipos I y II, numerosas formaciones pseudoquísticas delimitadas, y con material amorfo, focos de calcificación distrófica y escasos Hassall típicos (células reticulares del tipo VI). Con inmunoperoxidasa se observó positividad en las retículo-epiteliales y en los Hassall con el monoclonal CK, en linfocitos con ACL y CD45RO y con CD68 y S-100 en los histiocitos y en las retículo-epiteliales.

Por fin, en el **adulto** (hombre de 64 años) se apreciaron islotes de tejido tímico con corteza y médula diferenciadas. Con hematoxilina-eosina se observa un incremento de adipocitos y tejido conectivo denso. Los linfocitos están conservados en relación con el menor parénquima tímico. Los macrófagos abundan. Los Hassall son pequeños y compactos con estructura laminar conservada. La inmunoperoxidasa reveló similares imágenes a las anteriores descriptas para el niño de 10 años.

De todos estos hallazgos se puede concluir que: la **celularidad** disminuye con la edad y se incrementan los adipocitos, hecho que es frecuente en otros órganos. Los Hassall aparecen más rudimentarios, pero responden satisfactoriamente al inmunomarcado.

La presencia de pseudoquistes con necrosis central se debe a la involución de los Hassall, cuyo

origen se halla en discusión entre quienes sostienen que derivan de las células interdigitadas, y, aquellos que abogan por una relación con las células neuroectodérmicas (teoría del eje-hipotálamo+hipófisis+timo).

Lo concreto es que por la inmunomarcación (más sensible que las técnicas comunes) se puede sostener que el **timo aún en la etapa involutiva conserva potencialmente su importancia funcional**.

Investigadores de la Universidad de La Plata están estudiando las relaciones entre el timo y el sistema nervioso central sosteniendo la hipótesis de un **eje hipotálamo+hipófisis+timo**, al igual que la restitución de la función "endocrina" tímica por gene terapia a ratones envejecidos que recuperan los niveles séricos de timulina de su juventud.

Muy probablemente, estas "hormonas tímicas" sean necesarias para una apropiada estimulación de las **células dendríticas** en el proceso de presentación antigénica al linfocito virgen, y, activar así toda la respuesta inmune específica.

Se ha probado que la linfoquina **TSLP** (thymic stromal lymphopietin) actúa sobre las **CD CD11c+** que son inductoras potentes de los **LTCD4·Th2**, cuyo rol en las patologías alérgicas es indiscutido. Recientemente, Kleinjan (2011) confirmó que la **TSLP** está presente en la mucosa nasal, y, que influencia la interacción **CD→LT** a favor de los **LTCD4·Th2**. Otro grupo de investigadores evalúa la actividad de la hormona del crecimiento humana recombinante en pacientes portadores del HIV al observar la reconstitución del timo por mecanismos no muy claros aún. En los últimos años, se demostró que el receptor para la IL-7 (IL-7R) es un objetivo transcripcional de Notch, que controla el temprano desarrollo de los **LT** humanos con la consiguiente expansión de los progenitores T intratímicos. Las células no-T del timo son dendríticas que expresan p33 y el factor de transcripción Runx 3. Estas células tienen una función tolerogénica, tanto sean convencionales o plasmocitoides, generando **LT-reguladores (LT-reg)** naturales, que son esenciales para la adquisición de tolerancia y prevención de la autoinmunidad.

Numerosos trabajos de investigación sostienen que las citoquinas elaboradas por las células epiteliales influyen notoriamente sobre los procesos inmunológicos, como pueden ser, la activación, los patrones de migración celular, la quimiotaxis, la diferenciación y la proliferación de los tipos celulares participantes en la inflamación alérgica o no.

La **TSLP**, una citoquina similar a la IL-7, se probó en ratones y en humanos. En los primeros su efecto es sobre la progenie linfoidea mientras que en los segundos lo hace sobre la mieloide. En particular, la **TSLP** se comporta como un activador potente de las células dendríticas inmaduras de linaje mieloide. No obstante, se ha visto que la **TSLP** varía su accionar según la composición del infiltrado celular. Así, la **TSLP** secretada por las células epiteliales titulares condiciona a las **CD** para la producción de moléculas que favorezcan la inflamación alérgica.

La secreción de eotaxina e IL-8 atraen a los eosinófilos, y las **CD** favorecen la polarización de los **LT-CD4·Th2** inflamatorios productores de altas concentraciones de **TNF $\alpha$** .

Estas células inflamatorias son atraídas por quimiocinas secretadas por las **CD** tales como **MDC** y **TARC** que favorecen la amplificación de la inflamación alérgica. Se ha demostrado que la **TSLP** de acuerdo con su localización y el microambiente existente, regula la generación de **LT** con diferentes funciones efectoras.

En el timo (órgano linfático primario) induce la producción de **LT** reguladores involucrados en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio. En la mucosa intestinal permite el equilibrio homeostático **Th2** o la generación de la respuesta inflamatoria **Th1**, y, en la piel la expresión de **TSLP** se relaciona con el eccema atópico.

En el ratón, esta citoquina segregada por las células epiteliales tímicas no sólo afecta a las células involucradas en la llamada inmunidad innata sino también en la vertiente adaptativa. Fue originalmente clonada de la línea celular estromal tímica **Z201R.1**, que, al ser cultivada

con precursores linfoides de hígado fetal murino favorece el desarrollo de LB IgM<sup>+</sup> (Sims, 2000). Igualmente, el cocultivo con timocitos no fraccionados resultó en un aumento de la proliferación de los timocitos en concentraciones subóptimas de anticuerpos anti-CD3 (Friend, 1994). Si se cultivan células estromales tímicas aparece en su sobrenadante la IL-7, y otra molécula que por cromatografía de intercambio iónico con un perfil de elución distinto a la IL-7, que permitió identificar a la TSLP. La IL-7 induce LB220<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> mientras que la **TSLP** induce LB 220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> (Levin, 1999). El receptor para IL-7 (IL-7R), y otra cadena similar a la **TSLP** (Pandey, 2000; Fujio, 2000), se expresan en hígado, cerebro, médula ósea, timo y testículos (Al-Shami, 2004). La creación de un ratón deficiente en TSLPR mostró que la celularidad linfo-hematopoyética era normal, pero que su recuperación luego de emplear radiaciones subletales, a las 4 semanas, mostraba una disminución con respecto al ratón normal con defecto notorio de LTCD4<sup>+</sup>, LTCD8<sup>+</sup> y LB del timo y bazo.

Por el contrario, la inyección diaria de **TSLP** en dicho ratón, incrementaba la celularidad tímica y esplénica con acumulación de LTCD4<sup>+</sup> en la periferia. (Al-Shami, 2004). Todos los estudios realizados en los seres humanos (TSLPh) señalan que el receptor para esta citoquina es también un hetero-dímero constituido por el IL-7R y un nuevo miembro de la familia de las hemopoyetinas bautizado receptor para la **TSLP**.

La transfección de la línea celular proB Ba/F3 con este receptor induce respuesta celular a la TSLPh, pero no a la IL-7 o a la **TSLP** murina. (Reché, 2001).

A diferencia de la expresión del TSLPR en el ratón, en los humanos es expresado por las células de linaje mieloide, en especial, por las células dendríticas (CD) y los monocitos. La activación del complejo receptor-ligando en estas células lleva a la fosforilación de los factores de transcripción STAT-5 y STAT-3, y la liberación de quimiocinas como TARC (Thymus and activation-regulated chemokine o CCL 17) o como MDC (Macrophage-derived chemokine o CCL 22) que atraen a LT.

De igual manera, se demostró que CD mieloides tratadas con **TSLP** incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD80, y, poseen una gran capacidad para hacer proliferar LTCD4<sup>+</sup> vírgenes alogénicos. (Reché, 2001; Isaksen, 2002; Urashima, 2005). Funcionalmente, las CD activadas por la **TSLP** poseen la capacidad para activar LTCD4<sup>+</sup> vírgenes alogénicas hacia un fenotipo Th2 con secreción de altas concentraciones de IL-13, IL-15 y TNF- $\alpha$ , en menor medida de IL-4, pero nada de IL-10 ni de IFN- $\gamma$ .

Además, las CD activadas por la **TSLP** expresan OX40L y no producen IL-12. La interacción de OX40L con el OX40 del LT es necesaria para la generación de un fenotipo Th2. (Soumelis, 2002). Por ende, la actividad reguladora de TSLPh en la inmunidad adaptativa se logra por su acción sobre la CD (presentadora por excelencia) y ulterior polarización de los LT hacia Th2. Ello no ocurre con las células linfoides del ratón que no responden a la TSLPh.

Los corpúsculos de Hassall son grupos de células epiteliales localizadas dentro de la médula tímica que segregan citocinas, y **TSLP**, que influyen en el desarrollo de los timocitos, y, sobre las CD mieloides colocalizadas que expresan un marcador de maduración, el DC-LAMP, mientras que las CD inmaduras se ubican en la corteza y en la unión córtico-medular del timo y no lo expresan. (Watanabe, 2005).

Las CD derivadas del timo que se expusieron a la **TSLP** aumentan la expresión de marcadores como DC-LAMP, HLA-DR, CD80 y CD86, que favorecen la presentación antigénica a las células linfoides. Por otra parte, segregan quimioquinas como TARC y MDC que atraen Th2, pero no eliminan IL-12 ni TNF- $\alpha$ , que son proinflamatorias e inducen gran expansión de timocitos. Estos son principalmente CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, y la mayoría expresan CD25, fenotipo vinculado con los LT reguladores naturales que controlan en la periferia la respuesta de los LT efectores. (Watanabe, 2005).

Los timocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> estimulados por TSLP-CD presentan una baja proliferación frente a un estímulo, expresan el factor de transcripción Fox-p3 e inhiben la capacidad proliferativa de los LTCD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> estimulados por un anti-CD3 o un anti-CD28. Además se demostró que la inducción de estos LT – reg depende de la interacción con moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), de CD80 y de CD86, al igual que, de la IL-2. Los estudios hechos con LT vírgenes de la periferia estimulados con TSLP-CD muestran que a diferencia de los timocitos, los LT periféricos NO se diferencian en un fenotipo regulador CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Fox-p3<sup>+</sup>, lo que asevera la importancia del microambiente tímico en la diferenciación. Esto sugiere que las células autorreactivas que superan el umbral de afinidad para la selección NEGATIVA estarían sometidas a un proceso de selección adicional al final de su maduración, que, a través de TSLP-CD posibilitaría su diferenciación en el LT-reg que mantienen la tolerancia periférica. En los órganos linfoides periféricos o secundarios, se mantienen las células maduras, y, se encuentran con el antígeno sin generar un fenómeno inflamatorio, lo que Jameson en 2002, definió como “expansión homeostática de las células T”.

En el compartimiento de las células T de memoria se definieron subpoblaciones que se distinguen en su capacidad proliferativa, los patrones de migración y sus funciones efectoras. Así, se reconoce actualmente la existencia de LT de memoria central (LT-mc) y LT de memoria efectora (LT-me). Los primeros tienen patrones de migración a los órganos linfáticos secundarios, una función efectora limitada, pero proliferan y adquieren funciones efectoras frente a un nuevo desafío antigénico. Los segundos migran a los tejidos periféricos no linfoides, secretan rápidamente citoquinas efectoras frente a la estimulación antigénica, pero poseen una capacidad proliferativa limitada. (Lanzavecchia, 2005). Se identificó una subpoblación de LTCD4<sup>+</sup> que expresan el receptor para la **prostaglandina D2**, que, a su vez pertenecen a los LT-mc con un potencial de polarización hacia una respuesta Th2, por las citoquinas que segregan.

Por su parte, las TSLP-CD inducen una expansión sostenida después de múltiples estimulaciones de estos LT hacia el fenotipo Th2, aunque ocurre lo contrario si se los trata con anti-CD3/anti-CD-28 que los lleva a LT-me y luego a Th1. (Wang, 2006). Se describió que las CD presentes en la lámina propia intestinal emiten prolongaciones a través de las uniones de las células epiteliales para detectar las bacterias de la flora intestinal que se hallan en el lumen (Rescigno, 2001). En ausencia de un patógeno, estas células poseen la capacidad de promover la diferenciación de los LT hacia los Th2. (Alpan, 2001). También inducen a los LB → plasmocitos IgA<sup>+</sup> en un microambiente no inflamatorio Th2. Este condicionamiento de las CD intestinales depende del microambiente local, ya que las CD del colon inducen una respuesta Th2, aún en presencia de un estímulo antigénico inductor de respuesta Th1. En la piel sana en condiciones no inflamatorias la gran mayoría de LT son Th1 y expresan el marcador CLA (cutaneous lymphocyte antigen), y son células T-me (Clark, 2006).

La primera evidencia de la asociación de **TSLP** con enfermedades alérgicas humanas fue descrita en la dermatitis atópica que presenta una respuesta a LTCD4<sup>+</sup>-Th2. Biopsias de piel con dermatitis por sulfato de níquel corroboraron ambos hallazgos : el de la citoquina y el de la subpoblación Th2. En esta piel se detectan además CD con el marcador de activación LAMP, que, al parecer migraron de la epidermis a la dermis. Estos casos se acompañan de niveles séricos de IgE elevados. Los ratones deficientes del TSLPR no desarrollan inflamación pulmonar a antígenos inhalados y tienen una respuesta Th1 con altos niveles de IL-12, IFN- $\gamma$  y bajos valores de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE. Todo ello refuerza el papel de la **TSLP** en la atopía.

#### **Relación entre el sistema nervioso central y el timo y la médula ósea.**

El primero es el más estudiado dado que la médula ósea presenta dificultades para identificar a aquellos que estén vinculados estrechamente con los vasos sanguíneos. En el timo humano, fibras nerviosas liberadoras de TH ( tirosina hidroxilasa ), DBH ( dopamina  $\beta$ -hidroxilasa),

NPY , SP, neuroquininas A and B, CGRP, VIP y NA fueron halladas siendo la última la más abundante. El NPY se localiza junto a las fibras de NE que entran al timo por la cápsula o con las arteriolas superficiales. Las fibras de SP , CGRP y de VIP se ubican cerca de los mastocitos.

Ya Szent-Gyorgy en 1964, y, Vittadini en 1966, habían postulado una relación entre el hipotálamo+hipófisis y el timo, que hoy adquiere interesante relevancia en varios grupos de investigación. La hipófisis a través de la TSH→T4 = estimulación tímica, y, por el contrario, ACTH→corticoides más gonadotrofinas→testosterona = inhibición tímica.

Casi medio siglo después, los investigadores sostienen la existencia de un eje hipotálamo+hipofisario-tímico, con nuevos elementos, y, con actividad de neuropéptidos no descubiertos en aquel entonces. Ello abre infinitas posibilidades de investigación tanto a nivel inmunológico como farmacológico por el desarrollo de estas 2 ciencias en la actualidad.

### **HISTOFISIOLOGIA DEL TIMO Y DE LOS ORGANOS LINFATICOS.**

Estos órganos son aquellos en los que los linfocitos maduran, se diferencian y proliferan. Se dividen en 2 grandes grupos : los *primarios* o centrales y los *secundarios* o periféricos. Células primitivas totipotenciales o pluripotenciales o stem-cells o células reticulares primitivas o hemocitoblastos provenientes del saco vitelino y del hígado fetal dan origen a las progenies eritroidea y mieloidea que originan a los eritrocitos y a los granulocitos ya que los linfocitos derivan de un progenitor linfoideo.

Los primarios o centrales son el **timo** y la **médula ósea** mientras que los secundarios o periféricos son el bazo, los ganglios linfáticos, el apéndice, las amígdalas, las adenoides, las placas de Peyer del intestino, y, el tejido linfoideo asociado a las mucosas (MALT) cuyos más grandes exponentes son el intestinal (GALT) y el bronquial (BALT).

En los *primarios* maduran los LT y los LB sin estar presente el antígeno ni necesitarlo.

El **timo** es un órgano linfoepitelial, bilobulado que deriva del endodermo y –como ya se expresó- de las 3ª y 4ª bolsas faríngeas. Durante el desarrollo fetal aumenta mucho de tamaño y alcanza su máximo al nacer para luego involucionar lentamente hasta la pubertad para mantenerse muy pequeño en la edad adulta. Posee una corteza y una médula y la primera se divide en superficial y profunda. La corteza exhibe linfocitos de varios tamaños (timocitos), la mayoría de ellos inmaduros que al madurar entran a la médula y de allí a la circulación sanguínea donde son transportados a los órganos linfoides secundarios para encontrar en ellos *y no en otro lugar* - al antígeno. El **timo** posee células no linfoides ; así, existen células epiteliales especializadas o células nodriza o nurse, células dendríticas epiteliales y células dendríticas interdigitadas.

Las 2 primeras abundan en la corteza y las últimas en la médula donde hay células epiteliales adyacentes a los corpúsculos de Hassall. Los macrófagos se encuentran en la unión córticomedular. Las células nurse albergan en sus senos citoplasmáticos a los timocitos; las dendríticas epiteliales con moléculas del CMH. de las clases I y II seleccionan a las células útiles para el reconocimiento antigénico.

Las células epiteliales forman las "hormonas" involucradas en la maduración T (timopoyetina, timopentina, timosina  $\alpha$ -1 o  $\beta$ -1, fracción 5 y **TSLP**). La corteza superficial contiene entre un 5 y un 10 % de timocitos; la profunda (que es la más rica) entre un 75 y un 80 % y la médula de un 8 a un 10 % de los timocitos. La célula madre entra al **timo** y allí sufre una serie de transformaciones que se conocen con el nombre de ontogenia T, es decir, unos pasos fisiológicos que los llevan a la maduración como célula T.

Así, el **PRO-T** exhibe la enzima TdT o desoxi-nucleotidil-transferasa-terminal, los marcadores CD2, cCD3, CD5, CD7, CD45RO, genes de la cadena  $\beta$  del RcT, son doble negativas porque no

tienen ni CD4 ni CD8, y se pueden subdividir en CD25-CD44+, CD25+CD44+ y CD25+CD44- ; el **PRE-T** muestra a la TdT, los CD2, cCD3, CD5, CD7, CD45RO, cadena  $\beta$  del RcT y genes de cadena  $\alpha$  del RcT , CD4 y CD8 (doble positivas) y CD1.

Por fin, el **T maduro** o simple positiva tiene CD4 o CD8, sCD3, CD2, CD5, CD7, CD45RA que pasa a CD45RO si activa al antígeno, y, RcT  $\alpha\beta$  o RcT  $\gamma\delta$  según el caso. El 70/75 % son CD4 y el 25-30 % son CD8.

Los RcT  $\alpha\beta$  son de ontogenia tímica tardía, y, excepcionalmente extratímica mientras que los RcT  $\gamma\delta$  son de ontogenia tímica muy temprana y extratímica probable.

Se llama "selección positiva" cuando los LT aprenden a "ver" y reconocer al CMH propio mientras que se llama "selección negativa" cuando reconocen a antígenos propios con alta afinidad, y por ende, deben ser delecionados para evitar los fenómenos de autorreactividad y autoinmunidad ulterior a través de la apoptosis o muerte celular programada.

Cuando el LT "toca" a una molécula de clase I en la dendrítica epitelial expresará CD8 y viceversa si "toca" una de clase II sólo expresará CD4, por eso las dendríticas tienen gran contenido de moléculas del CMH. Si quedase algún LT autorreactivo que no fuera delecionado y "escapase" a estos mecanismos de control de la tolerancia central las células epiteliales interdigitadas y los macrófagos tratarán de inducirles un estado de "anergia" clonal o no respuesta ante auto-antígenos para conservar la tolerancia.

El CD3 constituye una importante molécula accesoria en la estructura del RcT; es un pentámero compuesto por 5 cadenas proteicas ( $\gamma$  de 21 kDa;  $\delta$  de 25 kDa;  $\epsilon$  de 25 kDa y 2  $\zeta\zeta$  de 16 kDa) que envían señales al interior de la célula.

### LAS "HORMONAS" TIMICAS.

En 1855, el fisiólogo Starling acuñó el vocablo "hormona" al concepto fisiológico de mensaje químico que desde entonces quedó firmemente establecido. Desde 1961, Auerbach, Nossal y Levey sostuvieron que el organismo tendría otro mecanismo de mensaje fisiológico que sería el celular y enfatizaron en que sería el timo el responsable de dicha función. Células originadas en el timo o que en este órgano reciben un mensaje o código químico irían luego a otros órganos linfoides a cumplir con su papel fisiológico fuera éste constituir un nuevo clon o familia celular o de transferir a otras células el código químico que portaban. Esta sería la función celulomisática (de missaticum = mensaje y éste a su vez de mittere = enviar o mandar un mensaje u orden). Esta interpretación no dista mucho de los conceptos actuales acerca de las funciones del timo y sus presuntas relaciones con el sistema nervioso central y el sistema endocrino aunque haya todavía mucho por esclarecer.

1.- La **timulina** es un nonapéptido que posee el ion zinc (Zn), tan importante en la Inmunología, producido por las células epiteliales tímicas exclusivamente. El Zn parece ser el responsable de la actividad biológica de esta molécula que está involucrada con la diferenciación linfocitaria T tanto intra como extratímicas. También se demostró que su producción y secreción está fuertemente influenciada por el sistema neuroendocrino, y, también se presume que la timulina ejercería acciones sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

En un modelo experimental animal, se unió el gene de la timulina a un vector de adenovirus y se inyectó intramuscularmente a ratones "desnudos" (nude) y a ratas envejecidas restituyendo la función linfocitaria en ambos casos a partir de los miocitos inoculados. Llamada antiguamente Facteur Thymique Serique por Bach en 1977 sigue un ritmo circadiano y los niveles fisiológicamente elevados de ACTH se correlacionan de forma positiva con los niveles plasmáticos de timulina. Recientemente, la timulina sería un efector de los mediadores proinflamatorios o citoquinas. Un péptido análogo de la timulina (PAT) posee efectos analgésicos en altas concentraciones y especialmente efectos neuro-protectores anti-inflamatorios en el sistema nervioso central y en particular sobre los astrocitos. Fue asociada

por Wade (1985) con la anorexia nerviosa.

2.- La **timosina**, fracción 5, de origen bovino, con un peso molecular (PM) entre 1000 y 15.000, constituye una familia de polipéptidos termo y ácido estables, que provoca la diferenciación T y potencia la función inmunitaria en modelos experimentales y humanos. Se la subdivide en timosina  $\alpha 1$ , timosina  $\alpha 2$ , timosina  $\beta 3$  y timosina  $\beta 4$  con similares efectos biológicos dependiendo del modelo experimental animal utilizado para tal fin.

3.- La **timopoyetina**, de origen bovino, con un PM de 5560, que comprende a un residuo de 49 aminoácidos, es termoestable, y produce la diferenciación de los linfocitos pretímicos aunque determina in vivo una alteración retardada de la transmisión neuromuscular.

4.- La **timosina  $\alpha 1$** , de origen bovino, con un PM de 3100, que abarca un residuo de 28 aminoácidos termoestables, y que aumenta la respuesta de los linfocitos de rata a los mitógenos con incremento de células Thy 1, 2 + y Lyt 1,2,3 + modulando la actividad de la TdT.

5.- La **timoestimulina** de origen bovino, con un PM de 12.000, que es una familia de polipéptidos poco caracterizada, y que produce marcadores y funciones específicos de los LT tanto en el animal inmunosuprimido como en el paciente con déficit inmunitario; en la rata incrementa la producción de IFN provocada con Poli IC.

6.- El **factor humoral tímico**, de origen bovino, con un PM de 3200, que es un polipéptido ( residuo de 31 aminoácidos) termolábiles, que restaura la reacción GVH en esplenocitos de ratones timectomizados neonatalmente y aumenta la respuesta a la Con-A y a la PHA de los esplenocitos normales.

7.- El **factor tímico sérico**, de origen porcino y murino, con un PM de 860, y que corresponde a un residuo de 9 aminoácidos termolábiles, aumenta la generación de células citotóxicas T in vivo e in vitro.

8.- La **timosina-alfa-1 ( $\alpha 1$ )** es un péptido recombinante análogo al natural sintetizado en el timo, que, inhibiría la replicación viral, el crecimiento neoplásico y aumentaría la diferenciación linfocitaria T y de NKC con producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-3 reduciendo la apoptosis de los LT.

Los niveles de hormonas tímicas circulantes, tanto en el hombre como en el animal de experimentación, tienden a bajar con la edad paralelamente a la involución morfológica del timo hasta llegar a ser prácticamente indetectables en el hombre después de los 60 años de edad. (1-2-3-4-5-6-9-10-11-12).

Aquí, se exponen los datos obtenidos *experimentalmente* con "hormonas tímicas" :

1): de origen **humano** (timoestimulina), 2): de origen **bovino** (timomodulina) y 3): y un péptido recombinante de **síntesis de laboratorio** (timosina alfa-1) sobre la actividad de los linfocitos de pacientes atópicos y no-atópicos de diversas edades cuantificando los niveles de la **IL-4** y del **IFN-gamma** producidos en un medio de cultivo celular.

## **MATERIALES Y METODOS.**

### 1.- "Hormona tímica humana o timoestimulina humana".

Se obtuvo a partir de timos humanos de niños comprendidos entre los 5 y los 10 años de edad fallecidos por accidentes viales en pleno estado de salud merced a una acordada de la Corte Suprema de Justicia de la Nación tramitada a través de la Morgue Judicial de la ciudad de Buenos Aires bajo la Dirección del Prof. Dr. Haroldo Nelson Donnewald (en su momento), luego de presentar un protocolo de investigación aprobado éticamente por dicho organismo. Los órganos obtenidos fueron pesados y estudiados histopatológicamente (cortes parafinados coloreados con hematoxilina-eosina) para valorar la viabilidad e integridad de los tejidos antes de proceder a la separación de las células constitutivas. De tal manera, los órganos muy deteriorados o hemorrágicos fueron descartados en consideración al sufrimiento celular y a



una presunta alteración de la producción de los factores tímicos a estudiar.

## 2.- Homogeneización de los tejidos.

Los órganos seleccionados en buen estado fueron cortados en trozos pequeños y sometidos a un homogeneizador del tipo Virtis a bajas revoluciones para lograr una papilla que posibilitara los pasos ulteriores. El único agregado posible en este paso fue la solución fisiológica a pH 7,2, a razón de 3 ml por cada gramo de tejido. Una vez obtenido este homogenado fue sometido a centrifugación a 14.000 g en centrífuga refrigerada, separándose un depósito y un sobrenadante. Este, a su vez, fue tratado con acetona para lograr su deslipidización, y con sulfato de amonio al 50 % para eliminar las proteínas séricas contaminantes. Todo precipitado fue eliminado y ulteriores diálisis contra solución fisiológica a pH 7,2 prepararon el producto para ser sometido a las columnas de Sephadex G-50.

## 3.- Cromatografía en columnas de Sephadex G-50.

Se utilizó una columna de Sephadex G-50 que tenía 780 mm por 22 mm y que se equilibró y se eluyó con buffer fosfato y ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4° C. Tres y medio mililitros del sobrenadante fueron sembrados y alícuotas de un mililitro del eluido fueron recogidas en el colector de fracciones con una velocidad de 20 ml/min. El contenido proteico de cada eluido fue determinado por absorbancia a 280 nm de densidad óptica en un espectrofotómetro Metrolab y medido cuantitativamente por el método de Bradford.

## 4.- Pesos moleculares.

Una serie de proteínas de peso molecular conocido usadas como marcadores proteicos, tales como, la lisozima (PM. 19,5 kDa), el inhibidor de la tripsina (PM. 28,8 kDa), la anhidrasa carbónica (PM. 37,1 kDa), la ovoalbúmina (PM. 54,5 kDa), la albúmina sérica bovina (PM. 97 kDa), la  $\beta$ -galactosidasa (PM.115 kDa) y la miosina (PM. 205 kDa) (BioRad lote 161-0318), se aplicaron a una columna de Sephadex G-200 de 780 mm por 22 mm que se equilibró, y se eluyó con un buffer PBS-ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4° C. Un mililitro de cada sustancia fue recogida y sometida al espectrofotómetro Metrolab a una densidad óptica de 280 nm. La concentración proteica de los marcadores fue de 13,5 mg en un volumen de 1,5 ml mientras que el extracto de timoestimulina tenía 147 mcg en un volumen de 3,5 ml (42 mcg/ml).

## 5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El SDS-PAGE fue preparado por el método de Laemmli empleando el gel al 15 % y corriéndolo en un aparato Mini-Protean II durante 2 horas a 120 V. Veinte microlitros de timoestimulina fueron cargados en orificios separados en condiciones diferentes de reducción y calentamiento para la detección de proteínas con azul brillante de Coomassie R-250 y luego la transferencia a una membrana de nitrocelulosa.

## 6.- Pacientes y muestras de linfocitos.

Se seleccionaron 30 sujetos afectados de rinitis perenne, de rinitis estacional y de asma bronquial extrínseca, con antecedentes heredofamiliares de **atopía**, y con valores de IgE sérica total superiores a  $210 \pm 74$  KU/L. Presentaron pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata francamente positivas a ácaros, blátidos, hongos anemófilos y pólenes de diversas familias autóctonas. Sus edades estaban comprendidas entre los 22 y los 78 años y eran 20 mujeres y 10 varones en buen estado de salud general, y sólo sometidos a medicación antialérgica convencional (anti-H1 y  $\beta$ 2 agonistas).

Al momento de la toma de la muestra sanguínea para separar sus linfocitos no estaban recibiendo inmunoterapia específica con alérgenos ni ningún medicamento inmuno-modulador. Al mismo tiempo, como **controles** se seleccionaron otros 20 sujetos de edades similares, 10 mujeres y 10 varones, no atópicos, cuyas IgE séricas totales eran de  $18 \pm 15$  KU/L, carentes de enfermedad respiratoria y/o dermatológica alguna ni de antecedentes heredo-familiares sospechosos de atopía cuyos linfocitos fueron sometidos a idéntico experimento que el de los atópicos. Así, 10 ml de sangre venosa obtenida en ayunas fueron sometidos a la técnica de

Boyum<sup>(7)</sup> para separar los linfocitos en un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/cm<sup>3</sup>) y luego conservarlos en un medio de cultivo tal como el RPMI 1640 (Gibco).

Todos los linfocitos estuvieron separados por paciente para valorar el efecto etario y su relación con la activación por las 3 "hormonas tóxicas". Estos péptidos fueron esterilizados (salvo los de la industria farmacéutica que estaban envasados en viales) por pasaje a través de un filtro Millipore de 0.22 μ antes de ser incorporado al cultivo celular.

#### 7.- Dosajes de IL-4 e IFN-gamma en el cultivo celular.

A un mililitro de la suspensión linfocitaria, cuya viabilidad se valoró microscópicamente mediante un frotis coloreado con Giemsa, se lo incubó con 10 mcg/ml de timoestimulina humana, con 4 mg/ml de timomodulina bovina y con 1,6 mg/ml de timosina-α-1, separadamente durante 24 horas al cabo de las cuales se centrifugó la suspensión y se midió la cantidad de IL-4 e IFN-gamma producidos, por el método de ELISA<sup>(29)</sup> empleando un antisuero de ratón contra la IL-4 e IFN-gamma humanas (Sigma Chemical Co. Clon n° 34019.111).

Un sistema indicador enzimático PAP-anti-PAP facilitó su medición en la lectora correspondiente. Esta metodología se aplicó con los linfocitos provenientes de sujetos atópicos y de las personas no-atópicas que sirvieron de grupo control de la experiencia.

#### 8.- Análisis estadístico de los resultados.

La comparación entre los grupos en estudio fue realizada por medio del método de la t de Student y del análisis de la varianza. Todos los métodos estadísticos presentaban dos colas; el valor de la p menor a 0.05 fue considerado de significación.

## RESULTADOS.

1.- Los timos humanos obtenidos pesaron entre 4,4 gr y 50,5 gr en un paralelismo con la edad del occiso consignándose un promedio de 26,86 gr para los 21 órganos viables estudiados histológicamente y que exhibieron integridad morfológica tanto de la corteza como de la médula.

2.- El fraccionamiento del sobrenadante del homogeneizado humano a través de la columna de Sephadex G-50 exhibió la presencia de 3 picos proteicos correspondientes a los tubos 12/17; 33/37 y 39/43 cuyos contenidos proteicos medidos por el método de Bradford fueron de 42 mcg/ml en total.<sup>(8)</sup>

La sumatoria de estos picos proteicos fue denominada aleatoriamente como "**timoestimulina humana**" con la cual se realizaron los experimentos con los linfocitos de normales no-atópicos y de atópicos sintomáticos de diferentes edades para valorar el efecto estimulante si lo hubiere.

3.- El SDS-PAGE reveló la presencia de por lo menos 3 grupos de bandas proteicas con pesos moleculares aproximados de 15/20 kDa el primero, de 28/30 kDa el segundo y de 50/60 kDa el tercero.

4.- Las concentraciones de la IL-4 en el medio de cultivo linfocitario de las diferentes muestras analizadas reveló resultados dispares según el grupo estudiado.

Así, los linfocitos controles de no-atópicos estimulados con timoestimulina humana mostraron valores decrecientes con la edad, pero con una media de 3,5 UI/ml y un DE ±1,643 dado que el valor máximo fue de 5,20 UI/ml (a los 30 años de edad) y el menor de 0,80 UI/ml (a los 70/79 años de edad). Los valores del IFN-gamma revelaron una media de 5,2 UI/ml y un DE de 0,82 con un máximo entre los 30 y 55 años y un mínimo entre los 70/79 años. Por su parte, los linfocitos de no-atópicos fueron tratados con la timomodulina bovina observándose una media de 3 UI/ml y un DE ± 1,623 con un valor máximo de 5,40 UI/ml (a los 30/39 años) y un mínimo de 1,50 UI/ml (a los 70/79 años). El IFN-gamma fue de 4,1 UI/ml y el menor de 0,98 UI/ml, a los 45 y 65 años. Por último, al incubarlos con timosina α-1 se observó un promedio de 1,791 UI/ml con un DE± 1,487 con un valor máximo de 3,15 UI/ml (a los 20 años) y un valor mínimo

de 0,20 UI/ml (a los 70 años), mientras que el IFN-gamma fue de 2,95 UI/ml a los 20 años y de 0,90 UI/ml a los 70 años.

La significación estadística de estos hallazgos fue la siguiente:  $p=0,50$ ,  $p=0,10$  y  $p=0,50$ , respectivamente, en los 3 grupos descriptos.

Dentro del grupo de linfocitos **atópicos**, los valores hallados fueron muy distintos.

Así, los incubados con la timoestimulina humana expresaron un promedio de 19,80 UI/ml con un  $DE \pm 3,46$ , mostrando un pico máximo a los 40 años y un mínimo a los 70 años; los estimulados con la timomodulina bovina exhibieron una media de 7,258 UI/ml con un  $DE \pm 1,34$ , mostrando un pico a los 30 años y un mínimo a 70 años, mientras que, por fin, aquellos estimulados con timosina- $\alpha$ 1, revelaron un promedio de 5,866 con un  $DE \pm 3,02$ , con máximo a los 20 años y un mínimo a los 70 años. Valores muy similares se lograron con el IFN-gamma a predominio de la timoestimulina humana con un pico entre los 30 y 50 años y un mínimo a los 79 años, con valores de 23 UI/ml como máximo y un mínimo de 8 UI/ml.

La significación estadística de estos hallazgos fue la siguiente:  $p \leq 0,0001$ ,  $p \leq 0,001$  y  $p=0,50$ , respectivamente, para los 3 grupos estudiados. **Tablas 1 y 2.**

## DISCUSION.

Desde hace varias décadas que se conoce el papel crucial que desempeña el timo en la ontogenia y en la homeostasis del sistema inmunológico tal como se resumiera en la Introducción. Desde que se sospechó que el timo podía desempeñar un papel “endocrino” se efectuaron numerosas investigaciones tendientes a identificar la posible “hormona” y así Metcalf (J.Cancer, 1956; 10: 442) encontró que los extractos (muy crudos por cierto) de la zona medular eran mucho más activos que los de la corteza, hallazgo experimental que concuerda con la naturaleza histológica de las 2 porciones tímicas.

Este autor demostró que un extracto acuoso termolábil de timo de rata era capaz de aumentar el número de linfocitos circulantes en ratas de poca edad. Levey, Trainin y Clark (J.Natl.Cancer Int., 1963; 31:199) demostraron, por otra parte, que la administración de extractos tímicos de conejo a ratas adultas incrementaba la incorporación de precursores radioactivos en el ADN y proteínas a nivel de los ganglios linfáticos, hecho no lográble con la inyección de otros órganos linfoides. El período crítico durante el cual el timo influye en el desarrollo inmunológico debe situarse en la vida embrionaria y en el período perinatal inmediato.

De hecho, numerosas experiencias clásicas así lo avalan pues la timectomía realizada en estas fases tiene consecuencias gravísimas en los animales de experimentación al igual que las deficiencias primarias (totales o parciales) en el ser humano condicionan cuadros clínicos de déficit de la inmunidad celular (T-dependiente) de indudable trascendencia aunque, en estos casos, los mecanismos pudieran ser más complejos e involucren a otros factores en su génesis.

Por el contrario, esta intervención en la edad adulta no provoca grandes modificaciones (Miller (Nature (London), 1961; 191: 248 ), y, hasta en casos muy especiales (miastenia gravis con timoma) su resección induce mejorías clínicas indudables.

Los astrocitos y las células epiteliales tímicas parecen poseer un origen común y elaboran un grupo de péptidos, transmisores, hormonas y citoquinas que funcionan como reguladores paracrinos y autocrinos. El timo y las quimioquinas **TARC**, **TSLP** y **CTACK** son responsables de la atracción y el tráfico de los LTCD4-Th2 en la piel de los pacientes atópicos que sufren de eccema crónico y parecen cumplir un papel relevante en el mantenimiento de dicha afección con las modificaciones histológicas in situ que ello significa. Burnet (Scient.Am, 1962; 206: 50) intentando resaltar lo más importante de lo tratado sobre el timo en un Simposio señaló que sus factores hormonales eran responsables de :

1.- la regulación de la linfopoyesis in situ; 2.-el mantenimiento de la viabilidad del timocito que

va a colonizar un órgano linfopoyético, y, 3.- la estimulación de la linfopoyesis en los tejidos linfoides con producción de plasmocitos que son los que sintetizan las inmunoglobulinas y de linfocitos pequeños responsables de la alergia tardía, pero que era prematuro sostener que una misma hormona era capaz de ejercer todas estas funciones.

Así, trató de establecer una función timotrópica y otra linfotrópica, más con criterio pedagógico y con prudencia investigativa que con pruebas concretas de su hipótesis.

Sin embargo, las interrelaciones (timo vs sistema endocrino) fueron sospechadas desde 1964 con los trabajos de Levey (Scient. Am., 1964; 211 : 66 ). Se desconoce si el hipotálamo-hipófisis ejerce una influencia sobre el timo, en especial, durante la vida fetal. No obstante, la acción del ACTH y de los corticoesteroides es bien conocida. Estas hormonas producen en forma dosis dependiente inhibición del timo, y, es posible que la hidrocortisona tenga un papel regulador de la secreción tímica y de su actividad celulomisática. La inyección de cortisol produce un aumento de las inclusiones PAS-positivas y disminución del número de timocitos en mitosis.

Esta relación inversa también se observó en el último trimestre del embarazo; en cambio, durante el parto, hay una rápida caída de las inclusiones y de los corpúsculos de Hassall y un renacer de la actividad mitótica. Esto lleva a reflexionar que las inclusiones son depósitos de material secretado que estimularía la mitosis timocítica y que los corticoides inhiben su liberación, tal como, lo postularon Csaba, Toro y Bodoky (Z.Mikorsk-anat. Forsch., 1963; 69: 467.) Según Szent-Gyorgy (Perspect.Biol.Med.,1964; 7 : 279) un factor humoral producido por el timo estimularía el crecimiento y retardaría la maduración sexual. Tanto los estrógenos como la progesterona y los andrógenos ejercen efectos inhibidores e involutivos sobre el timo, aunque la mayoría de las experiencias se desarrollaron con estrógenos. En animales irradiados, los estrógenos pueden retardar y potenciar la actividad timolítica de las radiaciones. La acción inhibidora de las hormonas sexuales sobre el timo se realizaría a través de las suprarrenales, pero no se descarta cierta acción directa tal como se probó en animales a quienes se les había extraído la hipófisis y las adrenales. Vittadini (Medicina & Higiene,1966; 112 : 6.) demostró que en niños pequeños con hipertrofia tímica la estrogenoterapia inducía una rápida reducción del tamaño del timo.

Un hallazgo histopatológico de Damesheck (Ciba Foundation Symposium, London,1966) es la hiperplasia del timo en pacientes con tirotoxicosis lo cual fue corroborado en animales de experimentación al suministrarles tiroxina; ello podría significar que esta hormona tendría un efecto estimulante sobre el órgano. Ello no implica que el timo funcione como glándula de secreción interna autónoma, pero sí que varias hormonas podrían ejercer efectos positivos o negativos sobre su funcionamiento.

Así, mientras que la tiroxina tendría un efecto estimulante, los corticoides y la gonadotrofina exhibirían un efecto inhibitor. Las nuevas investigaciones acerca de un eje hipotálamo-hipófiso-tímico tendrían sustento sobre la base de experimentos realizados décadas atrás. En varios trabajos se discute el condicionamiento Pavloviano de la respuesta inmune.

Las ratas a las que se les administra sacarina como estímulo condicionado junto con el inmunodepresor ciclofosfamida como estímulo no condicionado (pero que en este caso se usa porque produce náuseas) se detectó más tarde que se condicionaban para supresión inmunitaria con la sacarina sola. Esta observación llevó a una serie de experimentos en los cuales la inmunidad mediada por anticuerpos y por células se deprimieron por condicionamiento. En un experimento inverso, se utilizó también el condicionamiento con éxito para reducir significativamente la dosis de ciclofosfamida que se requiere para controlar el lupus sistémico en ratones.

Más alejadamente, los mediadores de los mastocitos también se han podido liberar in vivo por estímulo condicionado a un olor en cobayos y a un estímulo audiovisual en ratas.

Este trabajo es la segunda presentación en nuestro país del empleo de "hormonas tímicas"

humanas valorando su actividad sobre los linfocitos, tal como lo hicieron en su momento Bena y Mordoh (Medicina, Bs.Aires, 1980; 40: 5-10) sobre la síntesis del ADN de linfocitos periféricos de pacientes con cáncer no valorando en aquel momento la producción de citoquinas dada la carencia de los reactivos específicos correspondientes.

En este caso, planificamos puntiliosamente el experimento habida cuenta de los datos discordantes de la bibliografía acerca de la utilidad o no de los tratamientos con factores u hormonas tímicas de cualquier origen, generalmente animal, en las enfermedades atópicas. (13-14-15-16-19-20-21-22-23).

Al compararse los hallazgos entre los diferentes grupos de linfocitos se destaca que los controles no-atópicos tratados con la timoestimulina humana mostraron una producción sostenida de IL-4 (3,50 UI/ml, DE  $\pm$  1,643) con un descenso paulatino hacia los pacientes de edad propecta (grupo de 70 – 79 años), lo cual no resulta una novedad con respecto a los hallazgos de la literatura médica, y del prejuicio sobre la involución tímica. Estos mismos linfocitos controles tratados con timomodulina bovina presentan un comportamiento muy parecido al anterior con un promedio productivo de IL-4 de 3,00 UI/ml con un DE  $\pm$  1,623, y un descenso no tan marcado con el avance de los años.

Por su parte, el empleo de timosina- $\alpha$ 1 parece ser el menos relevante en la síntesis de IL-4 pues se logra un promedio de 1,791 UI/ml con un DE  $\pm$  1,487 y el valor mínimo en el grupo de 70/79 años, que obligaría a valorar la liberación de otras citoquinas linfocitarias ante su empleo farmacológico tan promocionado en infecciones virales crónicas (hepatitis B y C, HIV) y en neoplasias. Cuando se analizan los resultados obtenidos en el grupo de atópicos, se valora que espontáneamente estos linfocitos producen más IL-4 que, los controles aún a edades avanzadas, lo cual es coherente, con la condición de atopía de los linfocitos donantes, y, curiosamente, la posibilidad de la capacidad de reacción independiente de la edad.

Al comparar los grupos no atópico y atópico estimulados con timoestimulina humana se detectó una significación con una  $p \leq 0.00001$ , lo cual ratifica la notable estimulación de la "hormona tímica" sobre los linfocitos de los atópicos medida en función de la producción de IL-4. La comparación entre los 2 grupos al ser estimulados con timomodulina bovina la significación de la  $p \leq 0.001$ , y al emplear timosina- $\alpha$ 1, la  $p$  fue de  $\leq 0,05$ . O sea que todas las hormonas empleadas indujeron una liberación de IL-4 aunque la más notoria fue la de la humana, luego la bovina, y, por último, la timosina- $\alpha$ 1.

Todos estos hallazgos demuestran las propiedades linfoestimulantes de las "timoestimulinas" empleadas, no obstante, su parcial purificación y la valoración de otras acciones sobre los linfocitos humanos.

El objetivo de trabajar con una población de linfocitos de atópicos pretendió valorar su presunta utilidad en el tratamiento de las enfermedades alérgicas, tal como algunos autores especularon en su momento, pero los incrementos de la IL-4 serían **contraproducentes** en dichos tratamientos por la mayor síntesis de la IgE sérica de los tratados con las consecuencias clínicas que se podrían presentar. El aumento del IFN-gamma con su gran importancia biológica, no parece contrarrestar los efectos negativos del incremento de la IL-4.

Estos datos concordarían con los de Lurie y su equipo que no encontró ningún beneficio al tratar a niños asmáticos atópicos ( $n = 40$ ) con timulina, ya que otros autores habían encontrado valores séricos muy bajos de las "hormonas" y atribuyeron este hallazgo a la disfunción LTCD4-Th1 atribuida al proceso respiratorio.

De acuerdo a nuestros datos las timoestimulinas humana y bovina, y, en menor grado la recombinante favorecerían la funcionalidad LTCD4-Th2 lo cual es contraproducente, según Romagnani y su equipo, sobre el balance entre ambas subpoblaciones linfocitarias, que, por otra parte, la Inmunoterapia convencional con aero-alergenos permite corregir en la mayoría

de los casos, como lo asevera el Informe de la OMS de 1998. (Allergy, 1998; 44 (53), 2/42.

La timoestimulina **heteróloga** fue probada en infecciones virales como el herpes-zóster, y, en reacciones graves a vacunas con virus atenuados, en las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea y el LES, en patologías neoplásicas acompañando a los fármacos citotóxicos y a las radiaciones, en la sarcoidosis, en la candidiasis crónica, en el síndrome de Di George, en el defecto de la nucleósido-fosforilasa y de ADA, en la reacción de injerto versus huésped, en el síndrome de Wiskott-Aldrich y en el SIDA, con resultados poco convincentes la mayoría de las veces con su aplicación. (24-25-26-27-28-30).

Como estos productos son proteínas heterólogas, su aplicación reiterada puede desencadenar cuadros clínicos correspondientes a los tipos **I** y **III** de Gell & Coombs, tal como lo documentamos en un paciente con herpes-zóster oftalmofacial en la época anterior a los fármacos antivirales (p.ej. aciclovir) que sufrió brotes de urticaria aguda con angioedema y rinohidrorrea profusa luego de la aplicación reiterada de timoestimulina **bovina**.

Presentó pruebas cutáneas positivas inmediatas al producto convenientemente diluido según técnica e IgE-RAST > de 0,35 PRU/ml contra dicho antígeno (dato no publicado), mejorando con tratamiento sintomático y supresión total del fármaco sospechoso. (55-56-57-58-59-60). No obstante los hallazgos obtenidos, la purificación y mejor caracterización de estas "hormonas tímicas" podrían permitir conocer si alguna de ellas posee una actividad más específica sobre tal o cual citoquina o responde a un fenómeno general de respuesta del todo o nada.<sup>(17-18).</sup>

Como se advierte, todos estos datos abren un panorama muy interesante en la revalorización del timo, y su presunta participación en mecanismos reguladores poco conocidos todavía. (33-34-35-36-37-38-39-40). Por otro lado, se intentará vincular los hallazgos en el timo con la detección en los astrocitos de los mismos animales de las modificaciones de la GFAP o proteína gliofibrilar ácida y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como índice de su activación específica, tal como, se señaló en trabajos previos en el envejecimiento de ratas normales. (31,32,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54)..

## **BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Aiuti F. : Immunologic and clinical investigation on a bovine thymic extract. *Pediat. Res.*, 1979; 13 : 797.
- 2.- Aiuti F., Businco L. : Effects of thymic hormones on immunodeficiency. *Clin. Immunol. Allerg.*, 1983; 3 : 187.
- 3.- Aiuti F. : A placebo-controlled trial of thymic hormone treatment of recurrent herpes simplex labialis infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1984; 30 : 11.
- 4.- Alonso A. : Temas de Inmunoalergia. Tomos I al VI. Ed. CTM. Buenos Aires. 1998-2006.
- 5.- Ammirati P. : Immunoterapia con un estratto di timo bovino. *Folia Allerg. Immunol. Clin.*, 1977 ; 24 : 195.
- 6.- Bernengo M.G. : Thymostimulin therapy in melanoma patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1983 ; 28 : 311.
- 7.- Bistoni F. : Enhancement of natural killer cell activity in mice by a thymic factor. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1984; 17 : 51.
- 8.- Boyum A. : Ficoll-Hypaque method for separating mononuclear cells from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1966; supp.77.
- 9.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976 ; 72 : 248.
- 10.- Caputo G. : Effect of a thymic extract in a case of angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Haematologica*, 1982 ; 67 : 64.
- 11.- Consolini R. : Primary thymic endocrine failure in HIV-1 infected children. *Pathobiology*, 2000 ; 68 : 251.

- 12.- Daddi G. : A thymic hormone in pneumology. *Ind. J. Tuberc.*, 1984 ; 31 : 78.
- 13.- Davies E. : Treatment of cell mediated immunodeficiency with calf thymic hormone. *Pediat. Res.*, 1982; 16 : 573.
- 14.- Falchetti R. : Pharmacological and biological properties of a calf thymus extract. *Drug Exp. Clin. Res.*, 1977 ; 3 : 39.
- 15.- Filchakov F.V. : Mechanisms of inhibiting thymus endocrine function in tumor growth. *Fiziol. Zh.*, 2003 ; 49 : 56.
- 16.- Franchi F. : La timostimolina nel trattamento del lupus eritematoso sistemico. *Progr. Med.*, 1977 ; 33 : 893.
- 17.- Goldstein A.L. : Thymosins. *Clin. Immunol. Allerg.*, 1983 ; 3 : 119.
- 18.- Goya R.G. : Thymus and aging. *Gerontology*, 2002 ; 48 : 325.
- 19.- Goya R.G. : Thymulin and the neuroendocrine system. *Peptides*, 2004 ; 25 : 139.
- 20.- Labunets I.F. : Age related characteristics of the thymus and adrenal cortex function in CBA mice immunized by T-dependent antigen. *Fiziol Zh.*, 2005; 51 : 77.
- 21.- Labunets I.F. : The pineal gland's peptides factors and the rhythms of functions of the thymus and bone marrow in animals during aging. *Adv. Gerontol.*, 2004 ; 13 : 81.
- 22.- Laemmli U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227 : 680.
- 23.- Lauria F. : Effect of a thymic factor on T cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1984 ; 64 : 667.
- 24.- Lurie A. : Serum thymic hormone thymulin activity is normal in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1989 ; 84 : 386.
- 25.- Martelli M.F. : The in vivo effect of a thymic factor in Hodgkin disease. *Cancer* , 1982 ; 50 : 490.
- 26.- Merlino P.G. : Evidence for the direct action of thymulin on avian NKC. *Dev. Comp. Immunol.*, 2001; 25 : 337.
- 27.- Playfair J. & Chain B. : *Immunology at a glance*. Blackwell Ed., (London), 2005.
- 28.- Santarelli L. : Reduced thymulin production during occupational exposure to lead. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, 2005; 27 : 68.
- 29.- Savino W. : Abnormal thymic microenvironment in insulin-like growth factor II transgenic mice. *Neuroimmunomodulation*, 2005 ; 12 : 100.
- 30.- Trainin N. : Biochemical and biological properties of THF in animal and human models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 332, Ed. H. Friedman, 1979.
- 31.- Vanzani M.C., Caccuri R., Iácono R., Alonso A., Berría M.I. : Acerca de la astrocitosis espontánea y de su componente proliferativo en curso del envejecimiento. *Medicina (Bs.Aires)*, 2001; 61: 699.
- 32.- Vanzani M.C., Iácono R., Alonso A., Berría M.I. : Análisis cuantitativo de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en cultivos astrocitarios a largo tiempo. *Medicina (Bs.Aires)*, 2004; 64 : 678.
- 33.- Wada S. : Improved ELISA to measure thymosin alpha 1. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1988 ; 10 : 795.
- 34.- Wara D.W. : Thymic hormones in primary immunodeficiencies. *Clin. Immunol. Allerg.*, 1983; 3 : 169.
- 35.- Cuéllar A. : Linfopoyetina estromal tímica : regulación de la respuesta inmune y la enfermedad alérgica. *Universitas Scientiarum*, 2007 ; 12 (1) : 5-13.
- 36.- Naranjo P. : "Timo, inmunización y alergia", Ed. Universidad de Quito.- Ecuador.- 1969.-
- 37.- Ziegler S.F. : Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol.*, 2006 ; 7 : 709-714.
- 38.- Zhou B. : Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation

- in mice. *Nat. Immunol.*, 2005; 6 : 1047-1053.
- 39.- Yoo J. : Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J.Exp.Med.*, 2005 ; 202 : 541-549.
- 40.- Watanabe N. : Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat. Immunol.*, 2004 ; 5 : 426-434.
- 41.- Watanabe N. : Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+ CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 2005; 436 : 1181-1185.
- 42.- Wang Y.H. : Maintenance and polarization of human Th2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity*, 2006 ; 24 : 673-675.
- 43.- Urashima M. : Gene expression profiles of peripheral and cord blood mononuclear cells altered by thymic stromal lymphopoietin. *Pediatr. Res.*, 2005 ; 57 : 563-569.
- 44.- Stock P. : Induction of T helper type 1 like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyperreactivity. *Nat. Immunol.*, 2004 ; 5 : 1149- 1156.
- 45.-Soumelis V. : Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.*, 2002 ; 3 : 673-680.
- 46.- Rimoldi M : Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 2005 ; 6 : 507-514.
- 47.- Ito T. : TSLP activated dendritic cells induced an inflammatory Th2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.*, 2005 ; 202 (9) : 1213-1223.
- 48.- Reche P.A. : Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J.Immunol.*, 2001 ; 167 : 336-343.
- 49.- Gray D.H. : Controlling the thymic microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005 ; 17 : 137-143.
- 50.- Jameson S.C. : Maintaining the norm : T cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002 ; 2 : 547-556.
- 51.- Lanzavecchia A. : Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005 ; 17 : 326-332.
- 52.- Levin S.D. : Thymic stromal lymphopoietin : a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J. Immunol.*, 1999 ; 162 : 677-683.
- 53.- Liu Y.J. : Thymic stromal lymphopoietin : master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med.*, 2006 ; 203 : 269-273.
- 54.- Bach J. : Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature*, 1977 ; 266 : (5597) : 55-57.
- 55.- Hadley A.J. : Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. ,1997 ; *Neuroimmunomodulation*, 4 (2) : 62-69.
- 56.- Dardenne M. : Role of thymulin or its analogue as a new analgesic molecule. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 2006 ; 1088 : 153-163.
- 57.- Wade S. : Thymulin (Zn-facteur thymique serique) activity in anorexia nervosa patients. *Am.J.Clin.Nutr.*, 1985 ; 42 (2) : 275-280.
- 58.- Alonso A. : "Fundamentos de Alergia para el Médico General", Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1996.
- 59.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H., Varela M.R. : "Alergia atópica", Ed. H. Macchi, Buenos Aires, 1987.
- 60.- Alonso A., Pionetti C.H., Rodríguez S.R., Regueiro M.R., Mouchián K., Albónico J.F. : Efecto de las hormonas tímicas sobre la síntesis de IL-4. *Prensa méd argent.*, 2011 ; 98 : 133-139.



**TABLA 1.**

**VALORES DE LA IL-4 EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO CELULAR DE LINFOCITOS DE ATOPICOS (en UI/ml).**

Edades	Incubados con timoestimulina humana	Incubados con timomodulina bovina	Incubados con timosina $\alpha$ -1 recombinante
20 – 29	16,20	8,10	6,20
30 - 39	20	10,70	8,10
40 - 49	24,10	9,25	10
50 - 59	22,55	8,70	5,20
60 - 69	20,70	4,10	4,40
70 - 79	15,30	2,70	1,30
	X : 19,80 DE : $\pm$ 3,46	X : 7,258 DE : $\pm$ 1,34	X : 5,866 DE $\pm$ 3,02

Significación estadística : entre timoestimulina humana y bovina  $p \leq 0,0001$ .  
entre timoestimulina humana y recombinante  $p \leq 0,001$ .  
entre timomodulina bovina y recombinante  $p = 0,50$

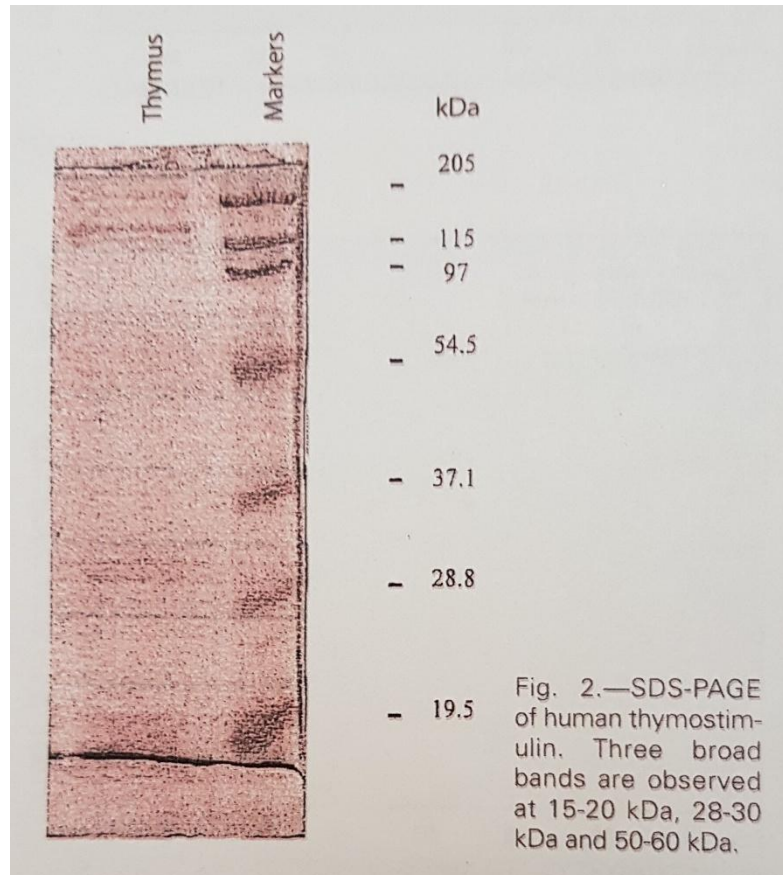
**TABLA 2**

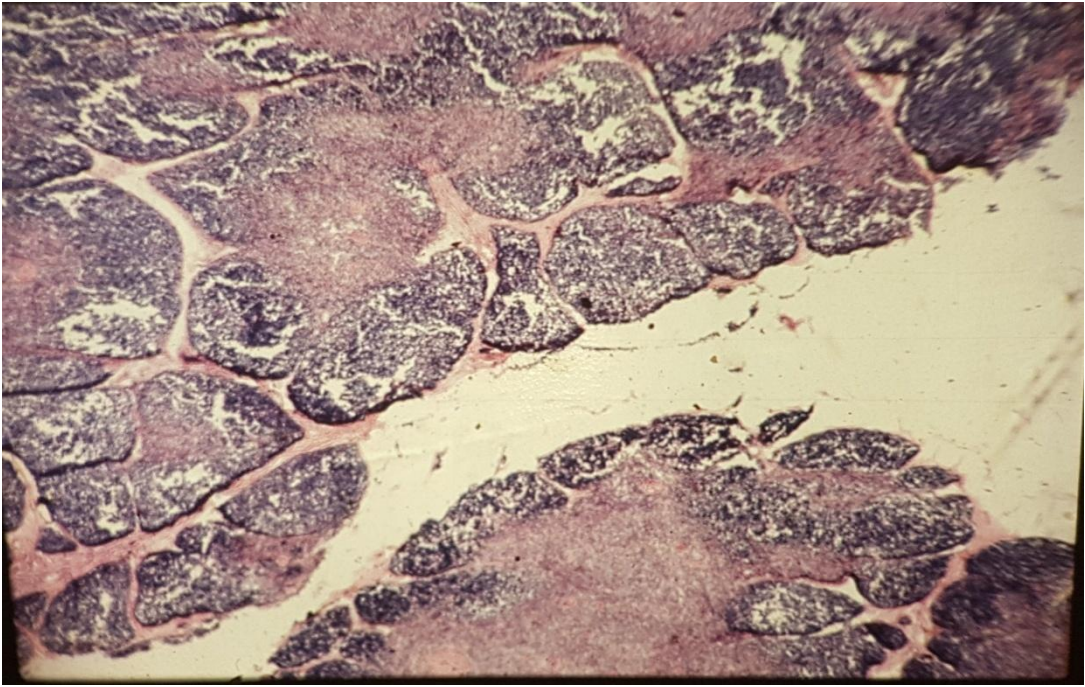
**VALORES DE LA IL-4 EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO CELULAR DE LINFOCITOS DE NO-ATOPICOS(en UI/ml).**

Edades	Incubados con timoestimulina humana.	Incubados con timomodulina bovina	Incubados con timosina $\alpha$ -1 recombinante
20 – 29	4,10	2,20	3,15
30 – 39	5,20	5,40	2,90
40 – 49	5,10	4,70	2,50
50 – 59	3,70	2,20	1,20
60 – 69	2,10	2,00	0,80
70 – 79	0,80	1,50	0,20
	X : 3,50 DE : $\pm$ 1,643	X : 3,00 DE : $\pm$ 1,623	X : 1,791 DE : $\pm$ 1,487

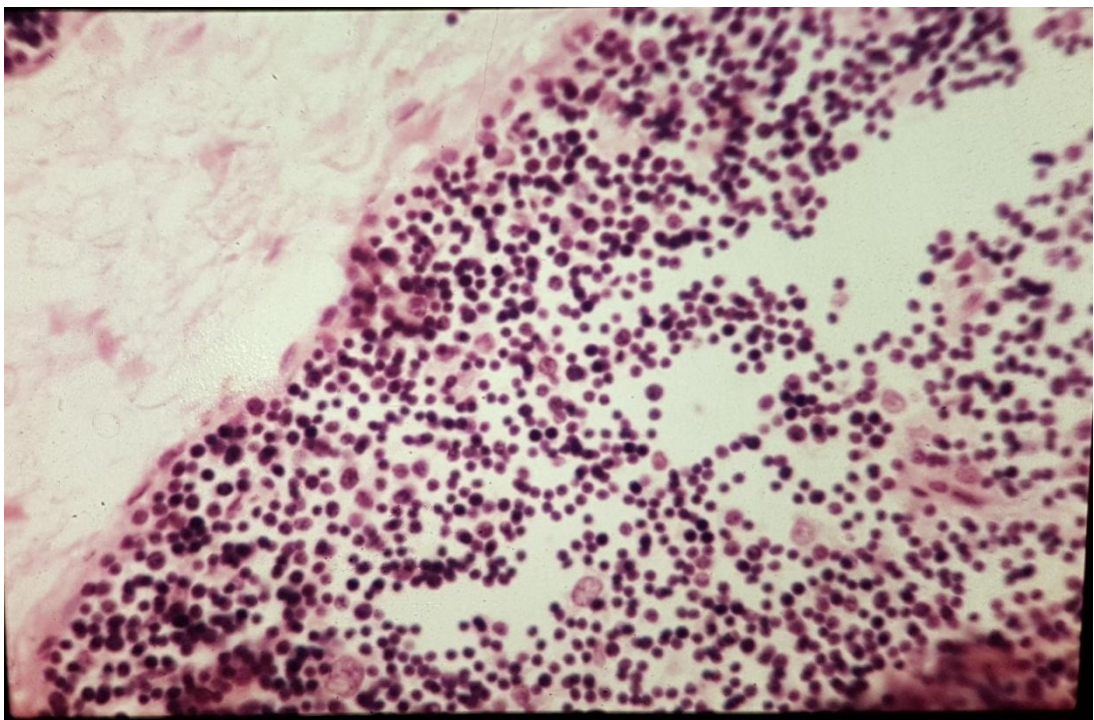
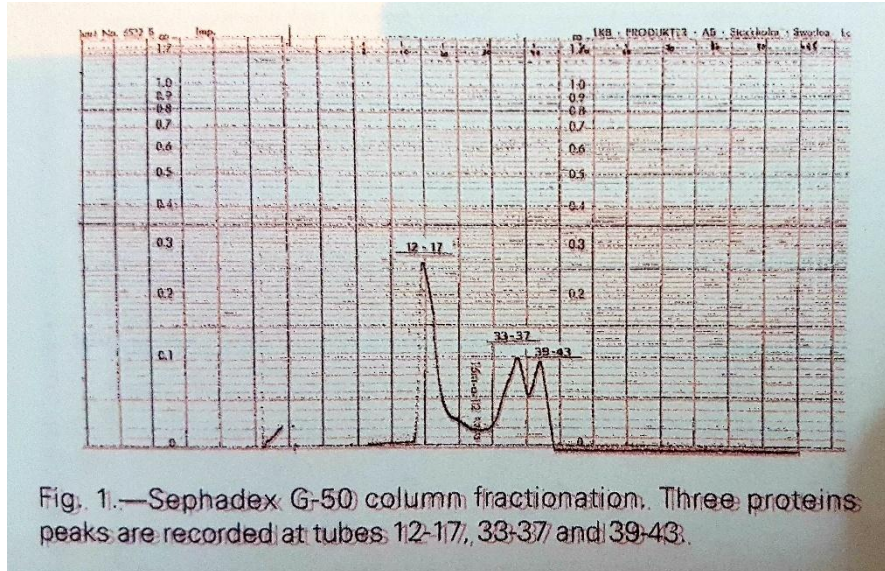
Significación estadística entre timoestimulina humana y bovina  $p = 0,50$ .  
entre timoestimulina humana y recombinante  $p = 0,10$ .

entre timomodulina bovina y recombinante  $p = 0,50$ .

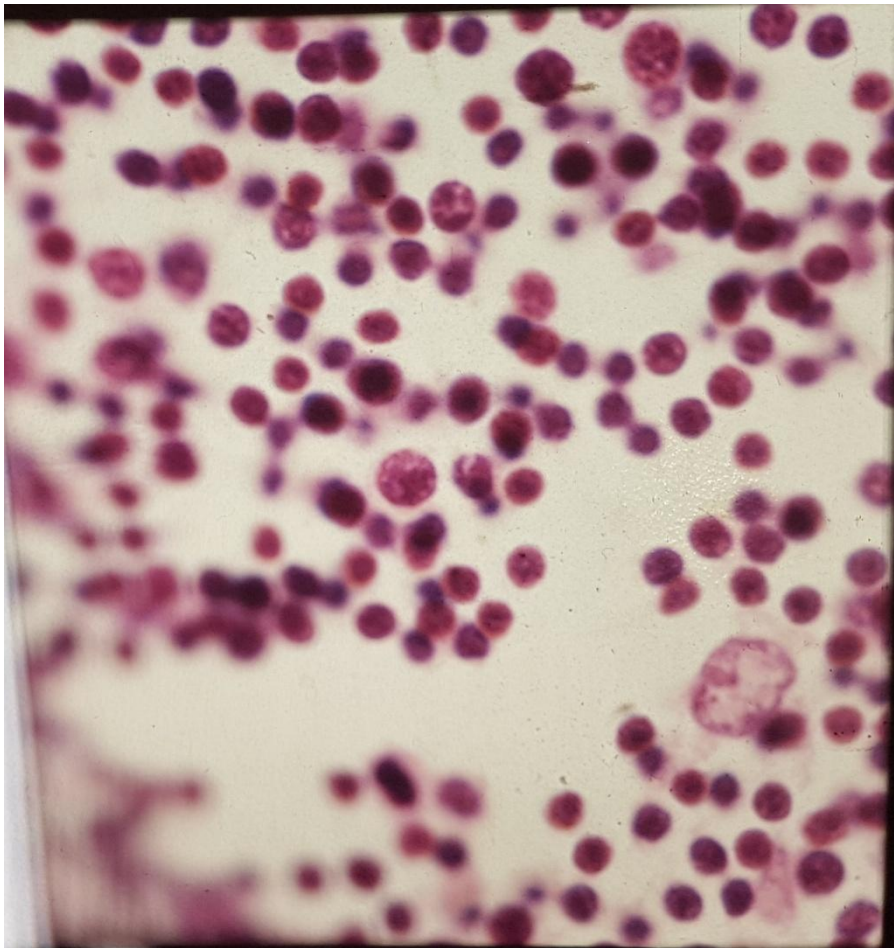
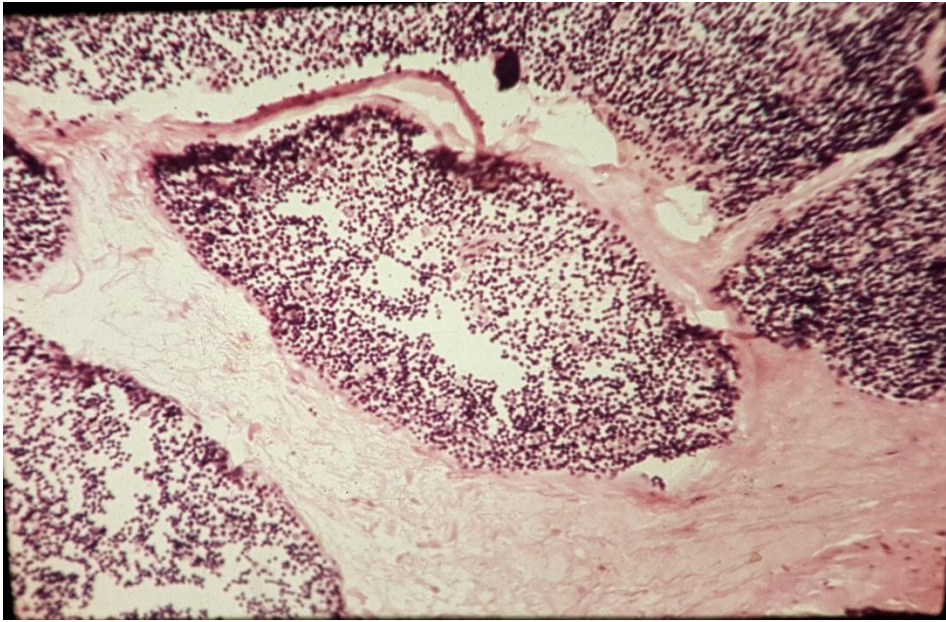












## ANTICUERPOS Y CITOQUINAS EN LA INMUNOTERAPIA CON BIPOLARIS

J. F. Albónico, K. Mouchián, M. L. Bignone, S. R. Rodriguez, C. Iovannitti, A. Alonso.  
Div.Alergia e Inmunología.-Hosp. de Clínicas.-Centro de Micología. Cátedra de  
Microbiología.UBA.SCA.ANCBA.-

Se exponen los resultados obtenidos luego de 3 años consecutivos de vacunación con un extracto del hongo anemófilo *Bipolaris australiensis* en 12 pacientes atópicos (IgE sérica total basal de 230,50 KU/L con un DE  $\pm$  115,39) con una sinusopatía crónica compatible con la sinusitis alérgica fúngica documentada por el cultivo que arrojó un crecimiento de colonias negras con micelio tabicado, macroconidias elipsoides y tabiques con conidióforos. Luego de realizar las pruebas intradérmicas con el extracto fúngico que resultaron positivas, se valoraron en sus sueros los niveles de IgE-anti-*Bipolaris*, IgG-anti-*Bipolaris*, IL-2, IL-4 e IL-4R por ELISA. Solamente 7 pacientes aceptaron, como único tratamiento, la inmunoterapia por 3 años con inoculaciones semanales de dosis crecientes del extracto (13 mg/mL), desde 1/10000 hasta 1/10 en el brazo por vía subcutánea. Los otros 5 pacientes, que actuaron como grupo control, se negaron a realizar inmunoterapia y continuaron con los lavajes sinusales con antifúngicos y tratamiento oral con ellos si fuera necesario. Los pacientes vacunados no experimentaron recidivas mientras que los no vacunados las sufrían si suspendían la terapia antifúngica. El valor sérico de la IgE-anti-*Bipolaris* descendió con una  $p \leq 0,02$ , la IgG-anti-*Bipolaris* ascendió con una  $p \leq 0,001$ , las IL-2, IL-4 e IL-4R descendieron con una  $p \leq 0,02$ ,  $p \leq 0,01$  y  $p \leq 0,001$ , respectivamente. El grupo control mostró para iguales parámetros una  $p = 0,50$ . Se enfatiza la utilidad de la inmunoterapia específica en las sinusitis fúngicas de los pacientes atópicos.

+++++\*\*\*\*\*+++++

**Informe Tesis Doctoral**  
**Universidad De Buenos Aires**  
**Facultad De Medicina**

**Efecto Crónico del Material Particulado Aéreo de la Ciudad de Buenos Aires**  
**Sobre la Salud: Estudio In Vivo e In Vitro**

Doctorando: Lic. Guillermo Alberto Maglione

Directores: Dres. Deborah Ruth Tasat y Alejandro Berra.

Consejero de Estudios: Acad. Prof. Dr. Angel Alonso

**Resumen**

En los grandes centros urbanos la calidad del aire afecta la calidad de vida. La atmósfera de las ciudades contiene una mezcla compleja de contaminantes: (gases monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y de azufre), compuestos orgánicos volátiles y material particulado (MP). Según la Environmental Protection Agency (EPA) y la International Agency for Research on Cancer (IARC) muchas de estas sustancias son consideradas mutagénicas y/o carcinogénicas pudiendo provocar impacto adverso sobre la salud de la población aumentando los índices de morbilidad y mortalidad principalmente por afecciones cardiorespiratorias. Los habitantes de las megaciudades debido al intenso tránsito vehicular y la gran actividad industrial, están constantemente expuestos a la contaminación ambiental, conformando un grupo vulnerable o de riesgo. En este sentido, es imperativo monitorear el aire de las megaciudades y realizar bioensayos de manera sistemática que permitan evaluar el impacto adverso de la contaminación ambiental aérea sobre la salud. Consiguientemente, en este proyecto, se expusieron ratones BALB/c a la contaminación aérea de Buenos Aires (UAP-BA), con el fin de analizar la respuesta biológica a nivel local (sobre las mucosas pulmonar y ocular) y sistémico (sobre hígado, corazón y marcadores bioquímicos en sangre). Los resultados de este estudio contribuirán a determinar la respuesta biológica y los mecanismos subyacentes que deviene de la exposición a UAP-BA.

**Objetivo General**

Evaluar en un modelo murino los efectos locales y sistémicos de la de exposición crónica a la contaminación aérea de la ciudad Buenos Aires (UAP-BA).

**Objetivos Específicos**

\* Emplear un modelo murino de exposición crónica a UAP-BA durante 1, 6, 9 y 12 meses, utilizando cabinas cerradas o "mini-bioterios" con bombas que puede inyectar aire desde el ambiente exterior (zona con alto tránsito vehicular).

- Recolectar, caracterizar y cuantificar las partículas aéreas de la ciudad de Buenos Aires a las que estuvieron expuestos los ratones.
- Realizar análisis histopatológicos, bioquímicos y moleculares para la evaluación del metabolismo oxidativo e inflamatorio a nivel local y sistémico sobre pulmón, hígado, corazón y en sangre de ratones expuestos crónicamente a UAP-BA.

**Avances realizados en el Proyecto de Tesis**

A fin de evaluar el impacto de UAP-BA a nivel sistémico, durante este período de investigación se obtuvieron datos bioquímicos en suero que complementan los estudios previos correspondientes a los animales expuestos crónicamente a UAP-BA para todos los tiempos propuestos: 1, 6, 9 y 12 meses.

**Metodología empleada**

El modelo utilizado para el estudio *in vivo* del efecto crónico de UAP-BA consistió en exponer ratones BALB/c en dos cabinas cerradas conectadas a una bomba eléctrica Metalcorte Eberle (model AB 71- B6/ MA, 1/4HP, Brasil) con un flujo de aire de 5 l/min.

Una de las cabinas recibió aire proveniente directamente del exterior correspondiente a una zona de alto tránsito vehicular (Uriburu 950 entre M.T. de Alvear y Paraguay) mientras que, la otra cabina recibió aire filtrado (AF). El aire filtrado se obtuvo luego de que el aire exterior pasara a través de un prefiltro Mark 80 y filtro C-cell - ASHRAE con una eficiencia del 95% (Microfilter SA, Argentina).

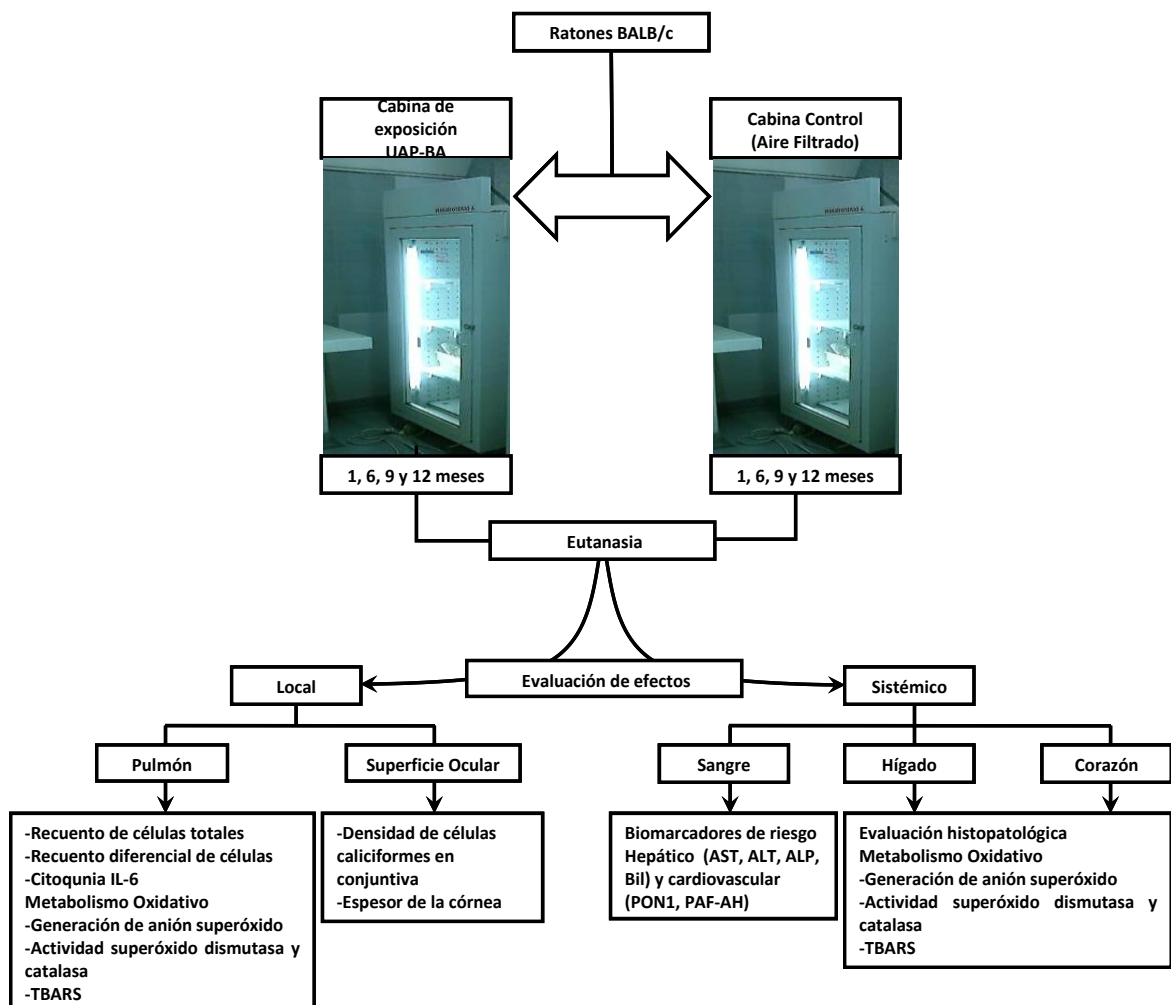
Para los experimentos se emplearon ratones hembras BALB/c de 21 días de edad los que se mantuvieron en condiciones estándares de luz y temperatura y recibieron alimento *ad libitum* previa exposición a UAP-BA.

Con el fin de reducir la variabilidad entre los grupos, los animales pertenecientes a una misma camada se dividieron aleatoriamente en los dos grupos que se describen a continuación:

- **Grupo UAP-BA:** Ratones expuestos al flujo de aire (partículas y gases) de la ciudad de Buenos Aires.

- **Grupo AF (Control):** Ratones expuestos al aire filtrado.

Luego de la exposición por 1, 6, 9 y 12 meses se evaluaron sobre superficie ocular, pulmón, corazón, hígado y sangre las respuestas inflamatoria y oxidativa (ver esquema 1).



**Esquema 1: Modelo experimental de exposición crónica.** Ratones BALB/c se expusieron a UAP-BA y AF durante 1, 6, 9 y 12 meses. Se evaluaron parámetros bioquímicos e histopatológicos a nivel local y sistémico.

## Resultados

### 1- Análisis de la fracción orgánica asociada a las partículas aéreas de Buenos Aires



Previamente, se realizó la caracterización fisicoquímica de las partículas urbanas aéreas de Buenos Aires (UAP-BA). El análisis por MEB y EDX reveló la existencia de micro y nanopartículas constituidas por un núcleo carbonoso con trazas metálicas.

Debido a que las partículas urbanas aéreas presentan numerosos compuestos orgánicos volátiles asociados a su superficie, se consideró relevante el análisis de la fracción orgánica asociada a UAP-BA. A tal fin, se recolectaron muestras en filtros de teflón (47 mm, Sartorius, 0,2  $\mu\text{m}$ ) empelando un muestreador Mini Volsampler (Airmetrics, Eugene, OR, USA). En las UAP-BA se detectaron 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) asociados a las partículas (Tabla 1). La concentración total de HAPs fue de 4,019  $\text{ng m}^{-3}$  lo cual excede el valor de referencia estándar de 1  $\text{ng m}^{-3}$  de B[a]P establecido para 24 h de exposición. Asimismo, en la tabla 1 se consigna el grado de carcinogenicidad para los HAPs detectados en este estudio (International Agency for Research on Cancer, IARC).

HAPs ( Abreviatura)	PM (g/mol)	Promedio ( $\text{pg m}^{-3}$ )	IARC Grupo*
Naftaleno ( <b>Nap</b> )	128.17	2156 $\pm$ 54	2B
Acenaftileno ( <b>Ace</b> )	152.20	472 $\pm$ 87	NC
Acenafteno ( <b>Ac</b> )	154.21	38 $\pm$ 1	3
Fluoreno ( <b>Fl</b> )	166.22	< DL	3
Fenantreno ( <b>Phe</b> )	178.23	257 $\pm$ 10	3
Antraceno ( <b>Ant</b> )	178.23	15 $\pm$ 2	3
Fluoranteno ( <b>Flu</b> )	202.26	97 $\pm$ 9	3
Pireno ( <b>Pyr</b> )	202.26	147 $\pm$ 3	3
Benzo(a)antraceno ( <b>B[a]A</b> )	228.29	38 $\pm$ 2	2B
Criseno ( <b>Chr</b> )	228.59	234 $\pm$ 20	2B
Benzo(b)fluoranteno ( <b>B[b]F</b> )	252.32	43 $\pm$ 2	2B
Benzo(k)fluoranteno ( <b>B[k]F</b> )	252.32	99 $\pm$ 4	2B
Benzo(a)pireno ( <b>B[a]P</b> )	252.32	44 $\pm$ 4	1
Dibenzo(a,h)antraceno ( <b>DB[ah]A</b> )	278.35	183 $\pm$ 11	2A
Benzo(g,h,i)perileno ( <b>B[ghi]P</b> )	276.34	196 $\pm$ 12	3
<b>Total</b>		<b>4019<math>\pm</math>221</b>	

**Tabla 1: Concentración y Clasificación de HAPs asociados a las Partículas Aéreas Urbanas de Buenos Aires:** Cuantificación de HAPs mediante cromatografía líquida de alta resolución en muestras de aire recolectadas en la Ciudad de Buenos Aires. <DL: Por debajo de los límites de detección.

\*Clasificación IARC: 1-carcinógeno para humanos, 2A-probablemente cancerígeno para humanos, 2B-posiblemente cancerígeno para humanos, 3-no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para humanos, NC: No clasificado.

Con el fin de identificar el origen de los HAPs asociados a UAP-BA se calcularon cocientes, de acuerdo con Slezakova et al (2013), que permiten estimar las fuentes emisoras de HAPs (Tabla 2). Los valores obtenidos se compararon con los valores de referencia, resultando que la principal fuente generadora de HAPs en la Ciudad de Buenos Aires corresponde al parque automotor. La fuente de emisión de gases y partículas proviene de emisiones vehiculares tanto de la combustión de gasolina como de diesel.

Ratios	Valor	Referencia	Fuente
Flu / (Flu + Pyr)	0.4	< 0.5	Gasolina
B[a]P / (B[a]P + Chr)	0.2	0.5	Diesel
B[a]A / (B[a]A + Chr)	0.2	0.38 – 0.64	Diesel
B[b]F / B[k]F	0.4	< 0.5	Gasolina
(Flu + B[b]F + B[k]F)/DB[ghi]P	1.2	1.6	Diesel

**Tabla 2:** Cocientes empleados para la estimación de fuentes generadoras de HAPs

## 2- Evaluación del Efecto de UAP-BA a nivel sistémico

Dado que las partículas aéreas urbanas de Buenos Aires son principalmente nanopartículas capaces de atravesar la barrera alvéolo-capilar, estas podrían provocar alteraciones en órganos a distancia como corazón e hígado. En relación a esto, se analizaron en suero de ratones controles y expuestos a UAP-BA parámetros bioquímicos de rutina y específicos de funcionalidad hepática y riesgo cardiovascular. Además, se evaluó el metabolismo oxidativo en estos órganos.

### 2.1 Parámetros bioquímicos séricos

Los valores obtenidos para los parámetros bioquímicos séricos se muestran en la Tabla 3. Ninguno de los parámetros evaluados mostró diferencias entre los animales expuestos a UAP-BA y sus respectivos controles. Sin embargo, la actividad de las enzimas indicadoras de posibles alteraciones de la función hepática y cardiovascular (AST, ALT y PON-1) varió entre los grupos de animales expuestos a UAP-BA y AF (ver informe anterior).

	Gluc (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Bil T (mg/dl)	Col. T (mg/dl)	TG (mg/dl)	C-HDL (mg/dl)
<b>Control</b> <sub>1M</sub>	277,6±24,4	42.3±1.58	0.048±0.007	0.20±0.01	94.3±4.1	168.014.7	70.6±2.0
<b>UAP-BA</b> <sub>1M</sub>	295.0±20.7	34.8±1.9	0.035±0.001	0.20±0.05	87.5±5.7	125.3±3.5	63.3±4.3
<b>Control</b> <sub>6M</sub>	274.6±30.3	41.9±2.9	0.22±0.01	0.23±0.02	92.6±3.5	234.2±25.7	78.0±2.1
<b>UAP-BA</b> <sub>6M</sub>	255.1±13.2	52.7±3.1	0.221±0.008	0.34±0.01	93.9±8.0	179.1±21.0	72.1±5.3
<b>Control</b> <sub>9M</sub>	224.5±20.5	50.6±2.6	0.248±0.007	0.18±0.02	89.2±2.5	204.0±18.4	76.1±1.7
<b>UAP-BA</b> <sub>9M</sub>	233.0±25.2	48.1±1.9	0.210±0.01	0.18±0.01	70.0±4.5	176.1±16.6	55.2±3.3
<b>Control</b> <sub>12M</sub>	209.2±18.9	48.4±1.8	ND	0.14±0.02	74.8±4.6	139.6±11.7	70.6±3.5
<b>UAP-BA</b> <sub>12M</sub>	204.8±24.3	42.3±0.8	ND	0.20±0.03	82.0±2.4	149.4±20.7	70.4±2.3

**Tabla 3:** Perfil lipídico de ratones expuestos a UAP-BA por 1,6, 9 y 12 meses. Glucosa (Glu), Urea, Creatinina, Bilirrubina Total ( Bil T ), Colesterol total (Col. Tot), Triglicéridos (TG), Lipoproteína de alta densidad (C-HDL). Las barras representan el valor medio ± ES, n=5-7.

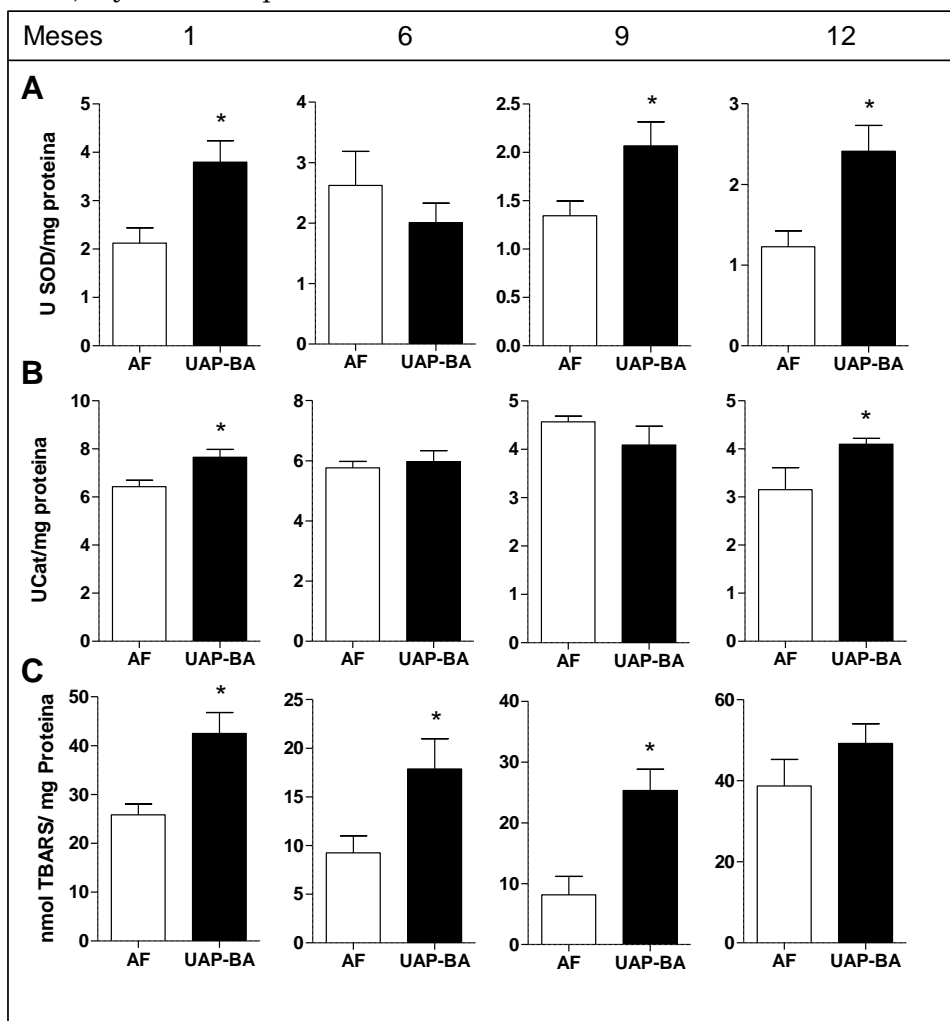
### 2.2 Evaluación del metabolismo oxidativo a nivel hepático

En los resultados previos se mostró que la exposición crónica a UAP-BA incrementa la actividad plasmática de las enzimas Aspartato Aminotransferasa (AST) y Alanina Aminotransferasa (ALT) acompañado de un mayor grado de esteatosis hepática.

Debido a la correlación positiva que existe entre la esteatosis y la alteración del estado oxidativo hepático se decidió analizar, en homogenado de hígado, la actividad de dos enzimas antioxidantes: la Superóxido Dismutasa (SOD) y la Catalasa (CAT). Asimismo, se determinó la lipoperoxidación lipídica mediante la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido

tiobarbiturico (TBARS).

Los resultados mostraron que la exposición a UAP-BA modificó la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT (Figura 1 A y B) aumentando significativamente al primer (1 mes) y a los 12 meses post-exposición a UAP-BA ( $p < 0.05$ ). La figura 1-C muestra el incremento significativo en la concentración de TBARS respecto a los controles para los animales expuestos durante 1, 6 y 9 meses ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1: Evaluación del metabolismo oxidativo a nivel hepático de ratones expuestos a UAP-BA por 1, 6, 9 y 12 meses.** A) Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD), B) Actividad de la enzima Catalasa (CAT) y C) Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las barras representan el valor medio  $\pm$  ES,  $n=5-7$ , \*  $p < 0,05$  respecto del control (AF).

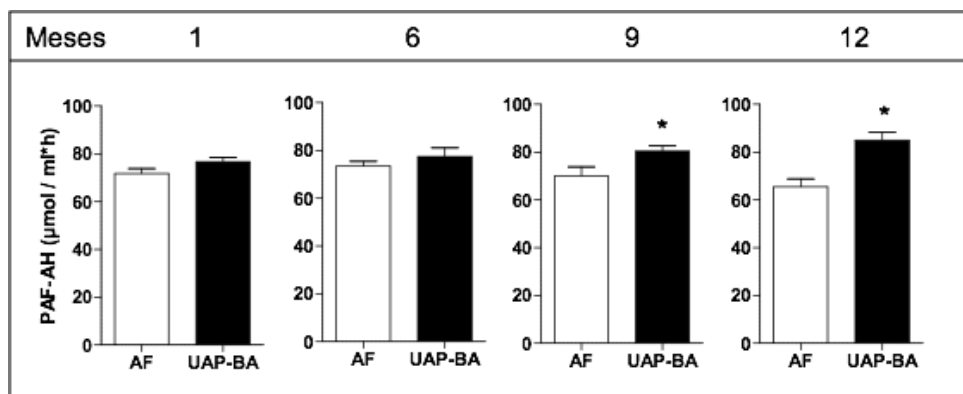
### 2.3 Evaluación de riesgo cardiovascular asociado a la exposición a UAP-BA

La Paraoxonasa-1 (PON-1) es una enzima que elimina componentes oxidados de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por lo que también está asociada al riesgo cardiovascular. Previamente, se informó que la exposición a UAP-BA genera una reducción significativa en la actividad de PON-1, sugiriendo un mayor riesgo aterogénico.

Con el fin de profundizar en el estudio del riesgo aterogénico que deviene de la exposición a UAP-BA, se evaluó la actividad plasmática del Factor Activador de Plaquetas Acetil Hidrolasa (PAF-AH), otra enzima con actividad antioxidante/antiinflamatoria asociada a la prevención de la aterogénesis.

La figura 2 muestra la actividad de PAF-AH en suero de ratones controles y expuestos a UAP-BA por 1, 6, 9 y 12 meses. La actividad de esta enzima incrementó significativamente en los sueros de los animales expuestos a UAP-BA durante 9 y 12 meses en comparación con los

suero de animales controles ( $p < 0.05$ ).

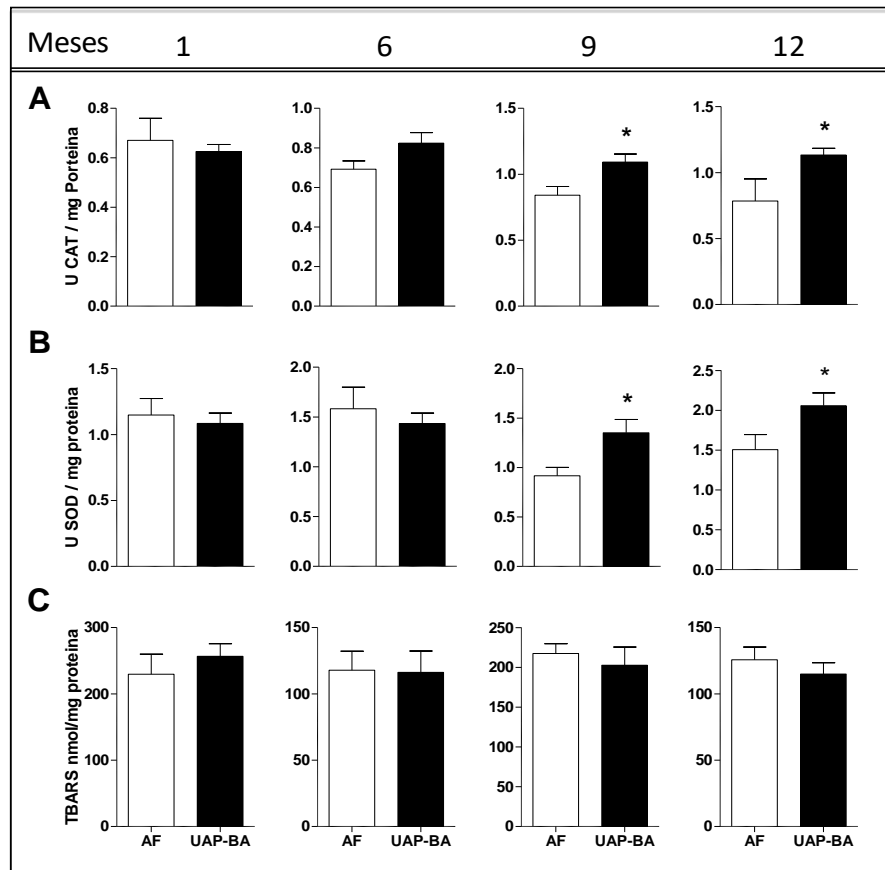


**Figura 2:** Actividad de la enzima PAF-AH en suero de ratones expuestos a UAP-BA por 1, 6, 9, y 12 meses. Las barras representan el valor medio  $\pm$  ES,  $n=7-10$ , \*  $p < 0,05$  respecto del control (AF).

#### 2.4 Evaluación del Metabolismo Oxidativo en Corazón

En base a los cambios observados en la actividad de las enzimas antioxidantes PON1 y PAF-HA y su relación con los procesos inflamatorios en la formación de ateromas, se evaluó el estado oxidativo del tejido cardíaco. Para ello, en homogenado de corazón, se evaluó la actividad de las enzimas SOD, CAT como así también la lipoperoxidación mediante el ensayo de TBARS.

Los resultados de la actividad de las enzimas SOD y CAT (Figura 3 A y B) indicaron que la exposición a UAP-BA hasta los 6 meses no indujo cambios significativos en tejido cardíaco mientras que, en animales expuestos por 9 y 12 meses, la actividad de CAT y SOD se vieron incrementadas significativamente respecto del grupo control ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la peroxidación lipídica, los resultados no mostraron cambios significativos para ninguno de los tiempos evaluados (Figura 3 C).

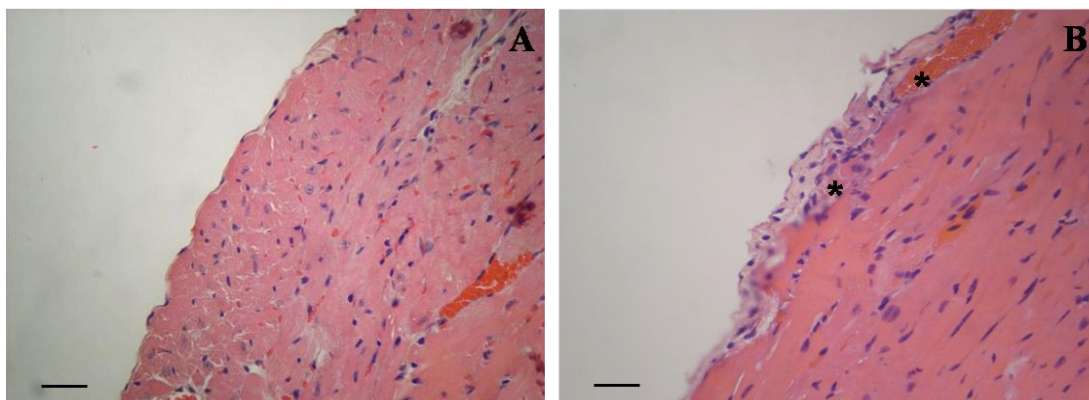


**Figura 3: Evaluación del metabolismo oxidativo a nivel cardíaco de ratones expuestos a UAP-BA por 1, 6, 9 y 12 meses.** (A) Actividad de la enzima Catalasa (CAT), (B) Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) y (C) Concentración de sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las barras representan el valor medio  $\pm$  ES,  $n=5-7$ , \*  $p<0,05$  respecto del control (AF).

### 2.5 Histología Cardíaca

A nivel cardíaco, la exposición crónica a la contaminación aérea de Buenos Aires, indujo cambios histopatológicos sólo a los 12 meses post-exposición (Figura 4). El epicardio de los ratones expuestos a UAP-BA mostró presencia de fibrosis focal del pericardio visceral con infiltración de células mononucleares (asteriscos) y congestión vascular (Figura 4 B).

Los animales controles expuestos durante 12 meses a AF no presentaron alteraciones histopatológicas (Figura 4 A).



**Figura 4: Microfotografías representativas de corazón provenientes de ratones expuestos a UAP-BA por 12 meses.** Las alteraciones histopatológicas se observaron solo a los 12 meses post-exposición UAP-BA. Los asteriscos indican dilatación vascular y/o infiltrados inflamatorios. Coloración con H & E. Ori. Mag. 400X, barra=50  $\mu$ m.  $n = 5-6$  por grupo.

**Publicaciones en revistas científicas con referato durante el período**

- **Maglione GA**, Orona NS, Astort F, Kurtz ML, TaveraBusso I, Mandalunis PM, Morales C, Berra A, Tasat DR. (2017). Chronic Exposure to Moderate Buenos Aires Urban Air Pollution (UAP-BA): Impact on Murine Cardiorespiratory System. *Environmental Pollution*. ENVPOL\_2017\_5453. Manuscript Under Review.
- Orona NS, Astort F, **Maglione GA**, Tasat DR. (2018). Lung Mediators Released by Particle - Exposed Macrophages Induce Cardiomyocyte Cellular Responses. *Toxicological Sciences*. TOXSCI-18-0012: Manuscript Under Review.
- Tesone AI, Lasagni Vitar RM, Tau J, Maglione GA, Llesuy S, Tasat DR, Berra A. (2018). Volcanic ash from Puyehue-Cordón Caulle Volcanic Complex and Calbuco promote a differential response of pro-inflammatory and oxidative stress mediators on human conjunctival epithelial cells. *Environmental research*. ER-18-505. Manuscript Under Review.

#### **Presentaciones en reuniones científicas**

Orona NS, Astort F, Ferraro SA, **Maglione GA**, Kurtz M, Agosta EG, Mandalunis, PM, Morales C, Tasat DR. *Efecto de la inhalación de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires: Alteraciones histomorfológicas, metabólicas y bioquímicas a nivel pulmonar y extra pulmonar en ratones jóvenes y adultos mayores.* 72° Congreso Argentino de Bioquímica. 22 al 25 de agosto de 2017, buenos Aires, Argentina.

Kurtz ML, **Maglione GA**, Lezon CE, Brites F, Friedman SM, Boyer PM, Tasat DR. *Desbalance oxidativo en un modelo de desnutrición crónica: efectos a nivel local y sistémico de la contaminación ambiental aérea.* 72° Congreso Argentino de Bioquímica. 22 al 25 de agosto de 2017, buenos Aires, Argentina.

Domingo MG, **Maglione GA**, Martin M, Boero L, Brites F, Tasat DR, Olmedo DG. *Tribocorrosión de implantes: Efecto biológico agudo de micro y nanopartículas de titanio Presentaciones orales.* Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 9 al 11 de noviembre del 2017, San Nicolás, Buenos Aires, Argentina

#### **Actividad docente de grado**

2017-Actual: Docente en la cátedra de Histología y embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. Asignatura: Histología y Embriología. Cargo: Ayudante de primera dedicación exclusiva.

#### **Resúmenes anteriores :**

En el informe anterior se mostró la respuesta de las mucosas pulmonares y oculares de ratones BALB/c expuestos durante 1 y 6 meses a las Partículas Aéreas Urbanas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA). La exposición de los animales se llevó a cabo en cabinas cerradas donde los animales recibieron el aire de una zona de alto tránsito vehicular (grupo UAP-BA) o a aire filtrado (grupo Control), se registró el peso periódicamente, luego de cumplido cada periodo de exposición se les practicó la eutanasia, se les realizó el lavado broncoalveolar (BAL) seguido de la extracción de los pulmones y el globo ocular para su procesamiento histológico. Las secciones histológicas de pulmón y del ojo se colorearon con H&E y PAS. Además, en el lavado broncoalveolar se determinó el número de células de totales y la distribución celular mediante tinción diferencial. La exposición a UAP-BA durante uno y seis meses no provocó diferencias significativas en el peso de los animales. Los pulmones de los animales expuestos presentaron un incremento en el número total de células a los 6 meses de exposición, al analizar las subpoblaciones celulares en el BAL estas mostraron un incremento en el porcentaje de polimorfonucleares (PMN) indicativos de un proceso inflamatorio. El análisis de la generación de anión superóxido en los BAL de animales expuestos a UAP-BA mostró un aumento significativo respecto del control en los tiempos evaluados. A nivel ocular se observó incremento de la densidad de células caliciformes siendo significativo al mes de exposición. La exposición crónica a UAP-BA indujo efectos adversos a nivel de estos dos blancos preferenciales de la contaminación ambiental aérea.

### Estudio in vitro:

La evaluación de la respuesta celular in vitro a UAP-BA se estudió inicialmente en la línea celular de adenocarcinoma de epitelio pulmonar humano A549. Los cultivos celulares se expusieron a 10 y 100 ug/ml de UAP-BA durante 24h., como control positivo se empleó un conocido contaminante ambiental, el residuo volátil de la combustión del petróleo (Residual Oil Fly Ash - ROFA). En los cultivos controles y expuestos a ambos materiales particulados (ROFA y UAP-BA) se evaluaron los siguientes parámetros biológicos: proliferación celular, generación de anión superóxido y producción de citoquinas pro-inflamatorias.

a) Proliferación celular: El análisis de la proliferación celular mostró un comportamiento distintivo para cada contaminante empleado. El contaminante UAP-BA, no alteró la proliferación celular para ninguna de las concentraciones empleadas. Por el contrario, ROFA provocó una marcada inhibición de la proliferación para la concentración más alta empleada (100 ug/ml); b) Generación de anión superóxido: La generación de especies activas del oxígeno, principalmente la producción intracelular  $O_2^-$ , no mostro cambios significativos en los cultivos expuestos a UAP-BA. Sin embargo, la exposición a la mayor concentración de ROFA (100ug/ml), inhibió la liberación de este radical libre; c) Producción de citoquinas pro-inflamatorias: La liberación de citoquinas pro-inflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), Interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) en los cultivos expuestos a UAP-BA ó ROFA mostró sólo cambios en los niveles de IL-8. La concentración de 100 ug/ml de UAP-BA y ROFA indujo un aumento significativo de los niveles de esta citoquina. Sin embargo, sólo la menor concentración de UAP-BA (10 ug/ml) fue capaz de provocar un incremento respecto de los controles. Ninguno de los dos contaminantes ambientales indujo variaciones sobre los niveles de IL-6 o TNF $\alpha$ .

En el período del segundo informe doctoral se continuó con la misma metodología de exposición crónica en cabinas por periodos más prolongados de 9 y 12 meses. La evolución de la respuesta de las mucosas pulmonares y oculares de ratones BALB/c expuestos durante 9 y 12 meses a las Partículas Aéreas Urbanas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) fue la misma que se describió para el primer informe.

Los resultados obtenidos mostraron que la exposición a UAP-BA durante 6 y 12 meses provocó reducción en el peso de los animales a partir de los 10 meses de exposición. Los pulmones de los animales expuestos presentaron un incremento en el número total de células en el BAL a los 9 meses de exposición, al analizar las subpoblaciones celulares en el BAL se observó un incremento en el porcentaje de polimorfonucleares (PMN) indicativos de un proceso inflamatorio. El análisis de la generación de anión superóxido en los BAL de animales expuestos a UAP-BA mostró un aumento significativo respecto del control en los tiempos evaluados. La exposición crónica a UAP-BA indujo efectos adversos a nivel de estos dos blancos preferenciales de la contaminación ambiental aérea.

Durante el período correspondiente al tercer informe doctoral se presentó la caracterización fisicoquímica del Material Particulado (MP) presente en las cabinas de exposición, además se mostraron los resultados referentes a los efectos locales y sistémicos en ratones BALB/c luego de la exposición crónica a UAP-BA por 1, 6, 9 y 12 meses.

El análisis de las partículas por microscopía electrónica de barrido (MEB), mostró que UAP-BA presenta micro y nanopartículas con un diámetro promedios de  $195 \pm 82$  nm y  $38 \pm 11$  nm respectivamente. Estas partículas pueden encontrarse libres o formando agregados con distinto grado de asociación entre ellas. La composición química elemental determinada por espectroscopia dispersiva de rayos X (EDX), reveló que las partículas de Buenos Aires están compuestas por un núcleo carbonoso con trazas metálicas (Si, Al y Fe).

En cuanto a los efectos a nivel local, en homogeneizados de pulmón de animales controles y expuestos a UAP-BA se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes Superóxido

Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT). Sólo en los animales expuestos durante un mes a UAP-BA presentaron incremento significativo de la actividad de ambas enzimas antioxidantes.

El efecto sistémico observado podría deberse a la exposición de partículas iguales o inferiores a 2,5 µm de diámetro, como las encontradas en UAP-BA. Estas partículas impactan no solo a nivel local, sobre las superficies ocular y respiratoria, sino que también pueden atravesar la barrera alveolo-capilar y llegar al torrente sanguíneo impactando órganos a distancia. Es por ello que con el fin de evaluar el efecto toxico de UAP-BA a nivel sistémico, se analizó en suero de animales controles y expuestos crónicamente por 1, 6, 9 y 12 meses los niveles de enzimas bioindicadoras de riesgo hepático y aterogénico.

Se evaluó la actividad de las enzimas ALT y AST, dos biomarcadores séricos indicativos de lesiones hepatocelulares. Los resultados mostraron que la exposición sostenida a UAP-BA por 6, 9 y 12 provocó incremento significativo de la actividad de ambas enzimas. En concordancia, el estudio de histopatológico del tejido hepático, reveló un mayor grado de esteatosis e inflamación, principalmente en las zonas 1 y 2 del parénquima hepático, en los animales expuestos a UAP-BA con respecto a los controles.

En cuanto a la evaluación del riesgo aterogénico, se estudió la actividad de la enzima sérica Paraxonasa-1 (PON-1), una esterasa sintetizada en hígado que se libera al torrente sanguíneo y se transporta unida a la HDL. La actividad de PON-1 previene la oxidación del colesterol LDL y preserva la función del colesterol HDL por lo que se le atribuye propiedades antioxidante y antiaterogénicas. A partir de los 6 meses de exposición a UAP-BA, los animales mostraron una reducción significativa en la actividad de PON-1 lo que podría ser indicativo de un posible riesgo cardiovascular.



# LA EPIGENÉTICA Y LA ALERGIA: PAPEL DE LA INMUNOTERAPIA ESPECÍFICA

## Introducción

Desde el conocimiento del Genoma Humano, año 2003, múltiples disciplinas de investigación, tanto en los animales como en los humanos, reforzaron sus proyectos para alcanzar la dilucidación de numerosas incógnitas, aún presentes, en un loable afán de sobrepasar el desafío que significó aquella concreción.

Sin embargo, muchas observaciones realizadas décadas atrás, por ejemplo, la de Conrad Hal Waddington, en 1942, en Lepidópteras del género *Pontia* (mariposas), que significó las variaciones fenotípicas de ellas, según las estaciones del año. Es decir, que hace 75 años un investigador señaló las posibles interacciones entre los genes de la mariposa y las condiciones ambientales que la rodeaban. Así, sin modificar su código genético, cambiaban de color y aspecto sus alas, según fuera invierno o verano. Un similar hallazgo sorprende en la actualidad, al comprobarse modificaciones en varios parámetros inmunológicos, según se midan (en el mismo sujeto) en invierno o en verano. De ahí surge esta verdadera revolución biológica que dio en ser bautizada como **epigenética**, que analiza y estudia todos aquellos factores *no genéticos* que perteneciendo al medio ambiente, influyen en el comportamiento del código genético *sin* causar cambios estructurales en el mismo.

Estos factores del ambiente celular, que nada tienen que ver con la herencia, juegan un papel importante en la ontogenia o desarrollo de un organismo, desde la fecundación del cigoto hasta la senectud, incluyendo numerosas enfermedades banales y mortales. Es una regulación de la expresión génica SIN cambios en la secuencia nucleotídica. O sea es el conjunto de reacciones fisicoquímicas y electromagnéticas que modifican la actividad del ADN, pero *sin* alterar su secuencia.

A partir de lo expuesto, se abre un inmenso horizonte investigativo, que ya se está desarrollando en varios laboratorios, estudiando factores que actúan en las enfermedades cardiovasculares, neoplásicas, neurológicas, reproductivas e inmunológicas.

La reinterpretación del Genoma Humano, ya que no podía explicar todo lo que se esperaba de su descubrimiento total, introduce la noción de que nuestras experiencias “marcarían” nuestro material genético de manera desconocida, por ahora, y que estas “marcas” podrían ser transmitidas a generaciones futuras.

Como se puede apreciar, todo un cambio de paradigma biológico.

La regulación **epigenética** induce cambios en la conformación de la cromatina y su interacción con las histonas. Si la cromatina se halla muy condensada los factores de transcripción (p.ejem.: el NFκB) no pueden acceder a una determinada región del ADN, y por ende, el gen no se transcribe, o sea, queda “amputado” o “silenciado”; si por el contrario, la cromatina no se encuentra condensada, los activadores de la transcripción se unen a las regiones promotoras y ocurre la transcripción del gen. En ningún caso, el ADN fue transformado o modificado.

Hay tres procesos **epigenéticos** de regulación: la metilación del ADN, la modificación fisicoquímica de las histonas y el papel de los ARN de pequeño tamaño que no codifican. <sup>(1-2-14-15-16-17-18-19-20)</sup>

La metilación del ADN es un proceso que ocurre en los mamíferos y en todos los organismos superiores, merced al cual, a la base citosina (recordemos que el ADN posee 4 bases: adenina, timina, citosina y guanina), se le agrega un metilo para dar una estructura más cerrada y protegida a la cromatina. Estudios muy recientes demuestran que la metilación es un proceso defensivo contra virus y parásitos, para impedir que ambos logren dañar al ADN. Sin embargo, si la metilación es excesiva es posible el “silenciamiento” de los genes. Se propone que factores del ambiente controlarían el grado de metilación, por los hallazgos en los mamíferos en los que

se comprobó que la metionina, el ácido fólico, la piridoxina y la colina, tendrían como función adicionar grupos metilo, provenientes de una dieta rica en dichas sustancias. (21-22-23-24-25-26-27-28)

La metilación ocurre en las regiones CpG con elevada concentración de citosina y guanina, que es donde están los promotores de los genes. Interviene una ADN-metil-transferasa, que mantiene y regula el patrón de metilación en las CpG. Como ejemplo destacado del “silenciamiento” de genes, vaya el hallazgo de la inactivación del cromosoma X, para tener la expresión monoalélica de ciertos genes, como se ha diagnosticado en patologías tumorales (p.ejem.: el síndrome de Beckwith-Wiedemann). Curiosamente, si por el contrario hay un bajo nivel de metilación (hipometilación), el individuo tampoco estará exento de enfermedades. (29-30-31-32-33-34-35)

La modificación fisicoquímica de las histonas, comienza en el nucleosoma, unidad constituida por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, ligadas a proteínas no-histónicas. Las tiras de ADN se “enrollan” en las histonas a la manera de un carretel y el hilo correspondiente. Por procesos de acetilación, fosforilación, deaminación, ubiquitinización, e isomerización de las prolinas, y, por supuesto, por metilación, las histonas sufren cambios conformacionales, que, determinan a la postre, si un determinado gen será silenciado o expresado.

Los ARN de interferencia o ARNi y los micro-ARN de interferencia o ARNmi, no codifican para una proteína específica, pero sus secuencias son complementarias para un ADN u otro ARN codificante, y, como tal, le impiden la traducción correspondiente. Es una forma de regulación negativa de la expresión a nivel post-transcripcional.

La herencia **epigenética** es la transmisión de información que NO depende de las secuencias de las bases nitrogenadas del ADN por mitosis o meiosis. La información **epigenética** modula la expresión de los genes SIN alterar la secuencia del ADN.

El **epigenoma** es la información **epigenética** global de un organismo. La impronta genética o el “imprinting” son genes que modifican su funcionamiento SIN cambiar su estructura; así, un gen se manifiesta de manera diferente si es de origen paterno que si es de origen materno. Un factor externo dejaría una “marca” o impronta sobre algunos genes “imprintables” y cambiaría su funcionalidad ulterior. Amplios estudios en gemelos univitelinos con idéntico código, exhiben algunas diferencias funcionales, que son de difícil explicación por el momento.

Este tipo de regulación génica se ha visto en la producción de tumores, en los efectos del envejecimiento celular por cambios en la metilación, en genes neurales asociados al estrés, en imperfecciones del desarrollo fetal, y todo conlleva a impedir la buena organización de la cromatina en el núcleo celular, regulando la expresión génica en las distintas células y manteniendo el patrón adecuado de expresión en el momento justo. Así, se codificarán y sintetizarán correctamente las proteínas, citoquinas, quimioquinas y receptores, de las células inmunocompetentes, que serán motivo de esta presentación.

### **La genética de la respuesta alérgica**

Hipócrates (460-377 a.C.) y Tito Caro Lucrecio (¿109-98 o 55 ? a.C.), fueron los primeros en señalar una respuesta anómala ante la ingestión de alimentos que a la mayoría no les provocaba daño. Desde entonces, hasta los albores del siglo XX, numerosos autores realizaron descripciones de cuadros respiratorios, digestivos, cutáneos y generales, vinculados con un “fenómeno” diferente, que recién en 1906, (Von Pirquet), fue bautizado como alérgico (“otra fuerza”).

Arthur Fernández Coca (1875-1959) y Edward Perry (1856-1938), acuñaron el vocablo atopía (otro lugar, raro, paradójico), que quedó reservado para los fenómenos de hipersensibilidad inmediata IgE dependiente. En 1916, merced al estudio de muchos pacientes alérgicos, Cooke y Van der Veer, establecieron que la llamada atopía, se heredaba genéticamente con un carácter autosómico dominante, y “ocurría solamente en familias”.

A partir de 1937, en que Gorer descubrió los antígenos del trasplante, se inició una imparable

carrera de hallazgos trascendentes en la inmuno-biología. Así, Snell, Dausset, Van Rood, Payne, Bodmer, Benacerraf, Ishizaka y Johansson, contribuyeron con la importancia de los antígenos de histocompatibilidad de clases I y II en la activación linfocitaria, y con la caracterización de la IgE, tan crítica en la funcionalidad de los mastocitos y basófilos, y en la participación de los procesos alérgicos-atópicos, de indudable carácter poligénico.

Desde Wyman (1872), Cooke (1916), Hamburger (1973), Marsh y Meyers (1980), que ratificaron ese carácter, y, curiosamente, lo relacionaron con sustancias del medio ambiente como desencadenantes y/o agravantes. Son clásicos los trabajos de Marsh y la polinosis, al igual que en nuestro país, los de Julio A. Cruciani y José A. Bózzola, con sus mapas fitogeográficos y sus floras alergológicas, y Krikor Mouchián con los péptidos inmuno-dominantes del polen de la gramínea *Lolium perenne*.

En la última década, los estudios genéticos sobre el asma y la atopía, avanzaron mucho gracias a los pequeños tándems de polimorfismos repetidos (STRP) del ADN, que permitieron identificar 5 regiones de gran interés:

- 1) en el cromosoma 5q vinculado a un grupo de citoquinas;
- 2) en el CMH (HLA) del cromosoma 6p relacionado con la polinosis;
- 3) en el cromosoma 11q para la subunidad  $\beta$  del RFc $\epsilon$  de la IgE, que, en años anteriores, Cooksondiera en llamar “el gen del asma”;
- 4) en el cromosoma 12q que contiene el gen que codifica para el interferón- $\gamma$ , y,
- 5) en el 14q el locus  $\alpha\delta$  para el receptor del LT.

Daniels en 1996 y el CSGA (Estudio Colaborativo sobre la Genética del Asma) en 1997, agregaron los siguientes datos:

- 1) el cromosoma 4q 34-35 y la eosinofilia ( $p < 0,0001$ );
- 2) el 6p 21 (región HLA) y la eosinofilia ( $p < 0,0001$ );
- 3) el 7p 13 y la hiperreactividad bronquial ( $p < 0,0005$ );
- 4) el 11q13 y las pruebas cutáneas positivas ( $p < 0,00005$ );
- 5) el 13q-14.1-14.2 y la atopía ( $p < 0,005$ ), y
- 6) el 16q 21-24 y los niveles de la IgE sérica total ( $p < 0,005$ ).

Al analizar las influencias étnicas, el CSGA demostró el ligamento entre el 5q 31-33 o grupo de las citoquinas en los caucásicos ( $p = 0,0187$ ); entre el 6p 21 en igual grupo humano ( $p = 0,0129$ ); entre el 12q 15-24.1 y los caucásicos e hispanos ( $p = 0,0042$ ) y entre el RcT  $\alpha\delta$  en el 14q 11.2 y los caucásicos ( $p = 0,0062$ ).

Otras siete nuevas regiones muestran ligamentos en el asma bronquial: en el 5p 15 y en el 17p 11.1 y 11.2 en afro-americanos ( $p = 0,0008$  y  $p = 0,0015$ , respectivamente); en el 11p 15, 13q 21.3-4 y 19q 13 en caucásicos ( $p = 0,0089$ ,  $0,0014$  y  $0,0013$ , respectivamente), y en el 2q 13 y en el 21q 12 en hispanos ( $p = 0,0005$  y  $p = 0,004$ , respectivamente).

Hizawa en 1998, halló 2 nuevas regiones que controlan la respuesta de la IgE contra el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* en el cromosoma 2q 21q-23 y el 8p 23-p21 ( $p = 0,0033$  y  $p = 0,0011$ , respectivamente), en caucásicos y afro-americanos.

Con anterioridad, esas regiones eran la 6p 21 y 13q 32-q34 ( $p = 0,0064$  para ambas) para los caucásicos y el 5q 23-q33 ( $p = 0,0071$ ) para los afro-americanos.

Los aspectos genéticos de la polinosis también fueron exhaustivamente estudiados. Los pólenes de las variedades de *Ambrosia* y de *Lolium* atrajeron la atención de los investigadores. Con respecto a estos últimos que serán motivo de uno de los proyectos a presentar, los Lol p I, Lol p II y Lol p III, están estrechamente vinculados con el HLA-DR ( $\alpha\beta$ -1\* 0301) o el DR3 (w17). Es posible que exista un sitio de unión en la molécula del CMH para los 3 alérgenos que permita una concordancia entre esos 3 epitopes y el DR3. La respuesta al Lol p III está relacionada con el DR ( $\alpha\beta$ -1\* 1101) y con el DR ( $\alpha\beta$ -1\* 1301) con una secuencia de 5 aminoácidos en el primer dominio de la primera región hipervariable. El análisis molecular de los genes DRB1, DRB3,

DQA y DQB sugiere que esta secuencia es imprescindible para la presentación de Lol p I, Lol p II y Lol p III. Niños alemanes con altos niveles de IgE sérica total tienen estrecha relación con el cromosoma 12q15-q24.1.

En los últimos años, se han detectado aspectos de la genética del asma bronquial, que señalan **1)**: la desmetilación de secuencias que unen el GATA al promotor del gen de la IL-4 con la hiper-producción de la misma, y, **2)**: la acetilación de las histonas H3-K9 y H3-K4 con efecto sobre los LTCD4-Th2, y sobre los genes de las IL-5 e IL-13 con su hiper-producción, y las consecuencias en el cuadro clínico de los pacientes.

### **Los objetivos del presente trabajo**

Luego de la breve información sobre la epigenética, se ha considerado la hipótesis que la **inmunoterapia (IT)**, de 3 a 5 años (Informe Técnico de la OMS, 1998), podría constituir una forma de mecanismo **epigenético**, pues como se va a documentar en nuestra presentación, dicha terapia modifica sustancialmente la funcionalidad de numerosas células involucradas en el fenómeno inflamatorio de la mucosa respiratoria, y, del organismo todo, pues el atópico es poseedor de una condición poligénica, documentada en el presente.

Con el propósito de dar mayor solidez a los datos que se exponen, se decidió encarar el efecto de la **IT** con 3 alérgenos diferentes (por separado) cuyo origen biológico fuera distinto, su composición química también, al igual que, su repercusión medio-ambiental y generadora de respuestas de hipersensibilidad en el 20% de la población.

Así, se analizarán los resultados de 3 proyectos con alérgenos diferentes: **1)**: de la **cucaracha** Periplaneta americana, aislado por nosotros y con similitudes bioquímicas con el Pa-7; **2)**: del **polen** de la gramínea Lolium perenne, con sus glicoproteínas 33 y 38, y, **3)**: del **hongo** Bipolaris australiensis, que por ser anemófilo es causante de la sinusitis fúngica alérgica.

En todos los casos, se realizaron valoraciones inmuno-alérgicas previas y posteriores a la **IT**, cuantificando valores séricos de proteínas, citoquinas y células inflamatorias.

Los análisis estadísticos revelaron el grado de significación, y, por ende, sostienen que un factor inducible y controlado por nosotros, fue capaz de modificar el comportamiento celular SIN generar modificaciones estructurales en su ADN.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Proyecto n° 1: Cucaracha Periplaneta americana. (Pa)**

**\*Antígeno:** un extracto del cuerpo entero de la **Pa** fue preparado por nosotros siguiendo la metodología descrita por Frugoni - Hansen y por Cruciani, siendo especialmente cuidadosos con las estructuras quitinosas del insecto. La **Pa** fue rigurosamente seleccionada entre las especies abundantes del país, siguiendo las reglas entomológicas. Ese extracto (3,5 mL) fue sometido a una filtración en una columna de Sephadex G-200, de 780 mm x 22 mm, y cuyos eluidos se hicieron con un buffer de ClNa-fosfato 0,15 M, a pH 8 y a 4° C. Se aplicó otro pasaje por columna de DEAE-celulosa (de 25 mm x 380 mm) con un buffer de 0,01 M a 0,5 M, pH 8 a pH 6. Las alícuotas de 1 mL de cada eluido fueron recogidas a una velocidad de 20 mL/min. El contenido proteico de los eluidos se determinó por el método de Bradford y por absorbancia a 280 nm de DO en un espectrofotómetro Metrolab, y las hexosas por el método del indol (mezcla de galactosa-manosa como controles), y lectura a 470 nm de DO en el espectrofotómetro.

**\*Técnicas inmunológicas:** los datos expuestos previamente, permiten aseverar la composición glicoproteica de estos antígenos, que, sometidos a un experimento en conejos, generaron anticuerpos IgG específicos, que positivizaron pruebas como la doble difusión en agar de Ouchterlony, la hemaglutinación pasiva de Boyden (título 1/1024) y la inmuno-electroforesis, con bandas de precipitación características. El Ouchterlony, reveló bandas con identidad total y parcial, con los antígenos de otras cucarachas (especies Blatella germánica y Blatta orientalis), al igual que, con un extracto de la vinchuca Triatoma infestans, en publicaciones ya realizadas. <sup>(3-4-5-6-7-11)</sup>

**\*Peso molecular:** fue determinado en comparación con marcadores proteicos conocidos tales como la anhidrasa carbónica, albúmina sérica bovina, alcohol dehidrogenasa, amilasa, apoferritina y tiroglobulina, dando un valor de 180 kDA para el extracto total.

**\*SDS-PAGE:** permitió identificar las propiedades proteolíticas y enzimáticas del extracto de **Pa**, certificando que al inhibir a la TLCK o tosyl-lysyl-chloro-methyl-ketone, se estaría en presencia de una serina-proteinasa o una proteinasa tripsina-like.

**\*Pacientes:** se dividieron en 3 grupos: el **grupo A**, de 50 pacientes, 28 mujeres y 22 varones, con edades comprendidas entre los 18 y 37 años, todos atópicos con el síndrome rinitis/asma y con valores séricos de la IgE entre 165 y 410 KU/L; el **grupo B**, de 20 pacientes, 12 mujeres y 8 varones, con edades entre los 33 y 47 años, con idéntico cuadro clínico y con valores séricos de la IgE entre 145 y 380 KU/L, y, el **grupo C**, de 20 sujetos, 15 varones y 5 mujeres, con edades entre los 25 y 52 años, completamente sanos, que poseían una IgE sérica total entre 18 y 37 KU/L.

Se recuerda que el valor de corte de la IgE sérica total para nuestra población ha sido establecido en 100 KU/L.

De esta manera, el **grupo A**, o grupo experimental, recibió **IT** con **Pa** durante 5 años, el **grupo B**, que **no** recibió **IT** actuó como control atópico, que al igual que el **grupo A**, solo recibió medicación farmacológica según su cuadro clínico y el criterio médico.

Finalmente, el **grupo C**, que **no** recibió **IT**, ofició de control absoluto de la experiencia. Todos los pacientes de los **grupos A y B**, revelaron pruebas cutáneas positivas al antígeno de la **Pa** mientras que los del **grupo C**, fueron totalmente negativos a dicho antígeno. Cada paciente fue intradérmicamente inyectado con 0.02 mL de **Pa**, solución fisiológica pH 7,2 e histamina 1/1000. La lectura la realizó siempre el mismo profesional a los 20 minutos, leyendo los milímetros del eritema-pápula, siendo positiva por encima de los 5 mm (Figs. 1 a 9).

**\*Radioinmunoensayos:** la IgE sérica total se midió por el método del PRIST con equipos elaborados por Phadebas (Farmacia, Uppsala, Suecia), que emplean las KU/L como parámetros de cuantificación. Las IgE e IgG específicas anti-**Pa** se midieron por el RAST, confeccionado con 33,5 mg/mL del **Pa** covalentemente unido a discos de celulosa (SS547) en un medio alcalino de pH 11 con bromuro de cianógeno durante 2 horas. Se midieron los resultados en PRU/mL (Phadebas-RAST-Units). Se tomaron muestras basales y al cumplirse cada año de **IT**. (8-9-10-12-13)

**\*RAST-inhibición:** se desarrolló de acuerdo con la técnica de Gleich empleando **Pa** como alérgeno principal, y otros como, el pólen de Ambrosia, el epitelio de gato y el hongo Alternaria, para establecer las diferentes especificidades del RAST con el **Pa**.

**\*Plan de IT específica:** fue realizada semanalmente por vía subcutánea en el brazo, con un volumen inicial de 0.05 mL hasta 0.50 mL, de una solución de **Pa**, conteniendo desde 1.67 mcg/proteína hasta 1.5 mg/proteína, al cabo de los 5 años de seguimiento. Luego de cada inyección, el paciente permanecía 30 minutos en el consultorio, para detectar y controlar cualquier reacción adversa inmediata que pudiese ocurrir.

**\*Determinación sérica de las IL-2, IL-4 e IL-4R:** la muestra que se tomó para el dosaje de las IgE e IgG se compartió para la detección de estas citoquinas. Todas las muestras se guardaron a -20° C. Las IL-2 e IL-4 se determinaron por ELISA provisto por Immunotech, mientras que el IL-4R fue detectado usando un anti-CD124 de conejo unido al I<sup>131</sup> preparado por nosotros de acuerdo al método de Ceska y Erikson.

**\*Evaluación clínica:** los síntomas de rinitis alérgica se valoraron antes y después de cada año de **IT** siguiendo los criterios de Okuda establecidos en las planillas de registro diario de los síntomas y signos. Dichos criterios establecen el número de ataques de estornudos, la intensidad de obstrucción nasal y la copiosidad de la rinohidrorrea.

**\*Procedimientos estadísticos:** la comparación y la significación entre los grupos se basó en el

análisis de la varianza, el test de Student (t), y el valor de la p menor a 0.05.

## **RESULTADOS**

**\*Pruebas cutáneas con Pa:** todos los pacientes de los **grupos A y B** (50 y 20 respectivamente) expusieron positividad entre 5 y 14 mm de eritema-pápula e incluso prurito, a la inoculación del alérgeno. Los sujetos del **grupo C** (20 personas) no expresaron ninguna reacción, solo al control positivo de histamina 1/1000. Al cabo de los 5 años de **IT**, los integrantes del **grupo A**, habían modificado su reactividad cutánea con disminución de la misma en 38 de ellos (de 14 mm a 6 mm) y negatividad total (de 7 mm a 0 mm) en los 12 restantes. Los pacientes del **grupo B**, que no recibieron **IT**, mantuvieron su reactividad inicial. Siempre se tuvo en cuenta que las testificaciones con alérgenos se realizaran **sin** la ingesta de anti-H1, anti-depresivos o  $\beta$ -agonistas, por lo menos, 72 horas antes de su realización, y por el mismo profesional en horas de la mañana.

**\*Dosajes de las IgE séricas totales (PRIST):** los valores basales para esta inmunoglobulina fueron los siguientes: **grupo A:**  $225 \pm 160$  KU/L; **grupo B:**  $150 \pm 120$  KU/L y **grupo C:**  $26 \pm 18$  KU/L.

Luego del primer año de **IT**, en el **grupo A** se detectaron los siguientes valores:  $240 \pm 140$  KU/L, en el **grupo B:**  $160 \pm 130$  KU/L, y en el **grupo C:**  $30 \pm 15$  KU/L.

Como puede advertirse, en los 3 casos, el valor de la p es **NO** significativo.

Luego del segundo año de **IT**, en el **grupo A:** se detectaron estos valores:  $220 \pm 130$  KU/L, en el **grupo B:**  $145 \pm 128$  KU/L, y en el **grupo C:**  $22 \pm 19$  KU/L.

Tampoco en este caso el valor de la p fue significativo.

Luego del tercer año de **IT**, el **grupo A:** mostró valores de  $200 \pm 110$  KU/L, el **grupo B:** de  $140 \pm 120$  KU/L y el **grupo C:** de  $24 \pm 20$  KU/L. Si bien la p no llegó al 0.05 se vio una declinación leve en los valores séricos de la IgE en el **grupo A** que recibió **IT**.

Luego del cuarto año de **IT**, el **grupo A:** expuso datos de  $180 \pm 90$  KU/L, el **grupo B:** de  $140 \pm 120$  KU/L y el **grupo C:** de  $25 \pm 20$  KU/L.

Aquí aparece la  $p < 0.05$  en los datos obtenidos en el **grupo A**, mientras que los demás grupos **no** experimentaron cambios de significación.

Luego del quinto año de **IT**, el **grupo A:** tuvo  $160 \pm 80$  KU/L, el **grupo B:**  $140 \pm 120$  KU/L y el **grupo C:**  $22 \pm 18$  KU/L.

Nuevamente la  $p < 0.05$  en los valores detectados solo en el **grupo A** que recibió **IT** específica.

**\*Dosajes de las IgE-anti-Pa séricas (RAST):** los valores basales para estos anticuerpos fueron los siguientes: para el **grupo A:**  $0,66 \pm 0,28$  PRU/mL, para el **grupo B:**  $0,53 \pm 0,21$  PRU/mL, y, para el **grupo C:**  $0,05 \pm 0,01$  PRU/mL.

Luego del primer año de **IT**, el **grupo A:** reveló  $1,05 \pm 0,37$  PRU/mL, el **grupo B:**  $0,55 \pm 0,22$  PRU/mL y el **grupo C:**  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Se verificó un ligero aumento de la IgE-anti-Pa, pero no llegó a la significación esperada. Luego del segundo año de **IT**, el **grupo A,** reveló  $0,70 \pm 0,14$  PRU/mL, el **grupo B,**  $0,58 \pm 0,24$  PRU/mL y el **grupo C,**  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Luego del tercer año de **IT**, el **grupo A,** reveló  $0,50 \pm 0,16$  PRU/mL, el **grupo B,**  $0,53 \pm 0,22$  PRU/mL y el **grupo C,**  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Luego del cuarto año de **IT**, el **grupo A,** mostró  $0,38 \pm 0,13$  PRU/mL, el **grupo B,**  $0,55 \pm 0,25$  PRU/mL y el **grupo C,**  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Se detectó aquí una  $p < 0,05$  entre los valores basales y los logrados en el 4° año de **IT**. Luego de quinto año de **IT**, el **grupo A,** reveló  $0,17 \pm 0,09$  PRU/mL, el **grupo B,**  $0,55 \pm 0,22$  PRU/mL, y el **grupo C,**  $0,04 \pm 0,01$  PRU/mL.

Nuevamente, la  $p < 0,05$  fue indicativa de un descenso estadísticamente significativo de los valores séricos de la IgE-anti-Pa.

**\*Dosajes de las IgG-anti-Pa séricas (RAST):** los valores basales para estos anticuerpos fueron

los siguientes: para el **grupo A**:  $18.71 \pm 9.12$  IU/mL, para el **grupo B**:  $15.8 \pm 12.33$  IU/mL, y para el **grupo C**:  $0.12 \pm 0.18$  IU/mL.

Luego del primer año de **IT**, el **grupo A** reveló  $85.70 \pm 48.37$  IU/mL, el **grupo B**, mostró  $16.2 \pm 11.38$  IU/mL, y el **grupo C**:  $0.14 \pm 0.18$  IU/mL.

Como se advierte, el **grupo A**, mostró un notable incremento de la IgG-anti-**Pa** específica, con una significación de  $p < 0.002$ .

Luego del segundo año de **IT**, el **grupo A**, mostró valores de  $186 \pm 88,46$  IU/mL, el **grupo B**, reveló  $18,4 \pm 14,20$  IU/mL, y, el **grupo C**:  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

En este caso, el incremento de la IgG-específica señaló una  $p < 0,001$ .

Luego del tercer año de **IT**, el **grupo A**, evidenció valores de  $290 \pm 122$  IU/mL, el **grupo B**:  $15,6 \pm 11,4$  IU/mL, mientras que el **grupo C**:  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

Aquí se aprecia una significación de  $p < 0,001$ .

Luego del cuarto año de **IT**, el **grupo A**, mostró valores de  $330 \pm 125$  IU/mL, el **grupo B**,  $17,2 \pm 11,7$  IU/mL, y el **grupo C**:  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL.

La significación de los valores del **grupo A** siguen estando en  $p < 0,001$ .

Por fin, luego del quinto año de **IT**, los valores registrados en los **grupos A, B, y C**, fueron, respectivamente, de  $378 \pm 132$  IU/mL, de  $12,9 \pm 10,9$  IU/mL, y de  $0,09 \pm 0,05$  IU/mL. La significación de los valores del **grupo A**, sigue estando en  $p < 0,001$ .

De los anticuerpos estudiados, hasta aquí, se aprecia un **descenso** significativo de la IgE-anti-**Pa** ( $p < 0,05$ ) acompañado por un **ascenso** notable de la IgG-anti-**Pa**, como anticuerpo protector y bloqueante de la reacción alérgica específica a la **Pa**, presumiblemente, integrante de los llamados anticuerpos asimétricos, como se demostró en su momento.

**\*Determinaciones séricas de las IL-2, IL-4 y del IL-4R:** los valores basales de estas citoquinas, es decir, antes de la **IT**, fueron los siguientes: para el **grupo A**: **IL-2**:  $168 \pm 119$  U/mL, **IL-4**:  $152 \pm 70$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2070 \pm 437$  c.p.m.; para el **grupo B**: **IL-2**:  $175 \pm 120$  U/mL, **IL-4**:  $148 \pm 66$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2055 \pm 450$  c.p.m., y para el **grupo C**: **IL-2**:  $122 \pm 66$  U/mL, **IL-4**:  $98 \pm 44$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1278 \pm 301$  c.p.m.

Luego del primer año de **IT**, se registraron los siguientes valores: para el **grupo A**: **IL-2**:  $211 \pm 72$  U/mL; **IL-4**:  $263 \pm 92$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2539 \pm 617$  c.p.m.; para el **grupo B**: **IL-2**:  $180 \pm 100$  U/mL, **IL-4**:  $144 \pm 67$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2033 \pm 550$  c.p.m., y para el **grupo C**: **IL-2**:  $120 \pm 60$  U/mL, **IL-4**:  $100 \pm 48$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1300 \pm 312$  c.p.m.

Como puede apreciarse, el **grupo A**, **no** expresa significación estadística para la **IL-2**, pero **si** para la **IL-4** ( $p = 0,01$ ) y para el **IL-4R** ( $p < 0,05$ ).

Luego del segundo año de **IT**, se detectaron los siguientes hallazgos: para el **grupo A**: **IL-2**:  $160 \pm 114$  U/mL; **IL-4**:  $147 \pm 75$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2110 \pm 429$  c.p.m.; para el **grupo B**: **IL-2**:  $170 \pm 95$  U/mL; **IL-4**:  $140 \pm 80$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2010 \pm 600$  c.p.m., y para el **grupo C**: **IL-2**:  $120 \pm 65$  U/mL, **IL-4**:  $100 \pm 50$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1200 \pm 300$  c.p.m.

Como se observa, ninguno de los valores del **grupo A**, mostró significación con respecto a los hallados en las muestras basales.

Luego del tercer año de **IT**, se documentaron los siguientes datos: para el **grupo A**: **IL-2**:  $88 \pm 45$  U/mL; **IL-4**:  $104 \pm 34$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1550 \pm 302$  c.p.m.; para el **grupo B**: **IL-2**:  $172 \pm 99$  U/mL; **IL-4**:  $138 \pm 77$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2020 \pm 530$  c.p.m., y para el **grupo C**: **IL-2**:  $130 \pm 69$  U/mL, **IL-4**:  $110 \pm 60$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1200 \pm 310$  c.p.m.

En el **grupo A**, se registran modificaciones en la significación de las citoquinas; así, la **IL-2** presenta  $p = 0,05$ , la **IL-4** expone  $p = 0,05$  y el **IL-4R**  $p = 0,01$ , con respecto a los valores basales.

Luego del cuarto año de **IT**, se registraron los siguientes valores: en el **grupo A**: **IL-2**:  $80 \pm 40$  U/mL, **IL-4**:  $93 \pm 32$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1500 \pm 300$  c.p.m.; en el **grupo B**: **IL-2**:  $168 \pm 93$  U/mL, **IL-4**:  $130 \pm 79$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $2000 \pm 510$  c.p.m.; en el **grupo C**: **IL-2**:  $130 \pm 70$  U/mL, **IL-4**:  $120 \pm 65$  U/mL, y para el **IL-4R**:  $1100 \pm 320$  c.p.m.

En el **grupo A**, vuelven a repetirse los valores estadísticos registrados al finalizar el tercer año de **IT** entodas las citoquinas donde la p es de 0,05, 0,05 y 0,01, respectivamente.

Luego del quinto año de **IT**, obtuvimos estos valores definitivos para nuestro proyecto: **grupo A: IL-2:** 72 ± 38 U/mL; **IL-4:** 70 ± 29 U/mL, y, para el **IL-4R:** 1400 ± 240 c.p.m.; **grupo B: IL-2:** 166 ± 92 U/mL, **IL-4:** 123 ± 72 U/mL, y para el **IL-4R:** 1900 ± 500 c.p.m., por fin, el **grupo C: IL-2:** 130 ± 70 U/mL, **IL-4:** 120 ± 66 U/mL, y el **IL-4R:** 1100 ± 300 c.p.m.

Se reitera la significación de la p=0,05, p=0,05 y p=0,01, para los valores de las **IL-2**, **IL-4** e **IL-4R**, respectivamente, en comparación con los pre-**IT** para cada citoquina.

**\*RAST- inhibición:** se probó fehacientemente la especificidad de la reacción de los anticuerpos IgE-anti-**Pa**, al lograrse el máximo de inhibición, cercana al 100 % con **Pa**, mientras que las absorciones con los otros alérgenos (pólen de Ambrosia, epitelio de gato y el hongo *Alternaria*) no fueron capaces de bloquear la reactividad de los anticuerpos específicos, y, por ello, su porcentaje de inhibición fue casi despreciable (15-25 %) inducido por fenómenos fisicoquímicos inespecíficos.

Así, con cantidades de  $10^{-6}$  y de  $10^{-5}$  del antígeno, la inhibición fue mínima, mientras que con  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  se dibujó una curva sigmoidea que logró su meseta entre  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ . Los controles no relacionados con el **Pa**, al no bloquear a la IgE-anti-**Pa**, proveyeron una curva casi plana al utilizar las mismas concentraciones desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-1}$ .

± **\*SDS-PAGE:** se emplearon mini-geles de 10 x 10 cm cada uno, de 1,5 mm de espesor, de acrilamida al 10%, con gelatina al 0,15%. Se sometieron a 120 V por 2 horas y cuando el control del azul de bromofenol llegó al punto establecido, se cortó la corriente, y los geles se lavaron 2 veces en agua destilada con Tritón-X-100 al 0,1% durante 15 minutos. Luego, se incubaron a 37°C en buffer a pH 6 con 0,1% de 2-[N-morpholino]-ácido etano-sulfónico (MES), Tris AcH 100 mM a pH 3,5 y Tris ClH 100 mM a pH 8,5 con 0,5 mM de dithiothreitol (DTT). La proteína remanente fue coloreada con 0,25 de azul brillante de Coomassie R-250 en metanol/ácido acético/agua 5:1:5 (v/v/v). Luego de la decoloración en metanol al 20% y ácido acético al 10%, las bandas activas aparecieron sin color sobre un fondo azul intenso. El lavado e incubación de los geles se realizó con y sin los inhibidores de las proteasas, como el E64 [L-trans-epoxy-succinyl-leucyl-amido (4-guanidino)-butano] 100 µM; tosyl-lysyl-chloro-methyl-ketone (TLCK) 0,5-1 mM; tosyl-phenyl-alanyl-chloro-methyl-ketone (TPCK) 0,5-2 mM; phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF) 2 µM; leupeptin 100 µM; o-phenan-troline 1 mM y pepstatin-A 100 µM; o-phenan-troline 1 mM y pepstatin-A 100 µM. Los marcadores de los pesos moleculares comparativos fueron: la albúmina sérica bovina (66 kDa), la ovoalbúmina (45 kDa), la anhidrasa carbónica (29 kDa), la α-2-macroglobulina (180 kDa), la β-galactosidasa (120 kDa), la fructosa-6-fosfoquinasa (84 kDa), la fumarasa (55,3 kDa), la lactato-dehidrogenasa (43.6 kDa) y la triosa-fosfo-isomerasa (30 kDa). En los Western-blots, las muestras fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa, y luego testificadas con suero de conejo anti-**Pa** 1/250 y suero humano anti-**Pa** 1/10. Luego de una incubación de 12 hs, se trataron con una IgG de cabra anti-conejo y con una IgG de ratón anti-IgE humana, copuladas con fosfatasa alcalina, y reveladas con nitro-blue de tetrazolio y 5-Br-4-cloro-3-indolyl-fosfato. La **Pa** reveló un patrón gelatinolítico en las bandas de 90, 78, 65, 34, 32 y 24 kDa, siendo la mayor actividad a pH 6. Con los inhibidores de las proteasas, se detectaron serin y cistein-proteinasas, del tipo tripsina, las más inmunorreactivas en 90, 78, 65 y 34 kDa.

(14-15-16-17-18-19-20)

**\*Fraccionamiento por columnas de Sephadex-G-200 y de DEAE-celulosa:** se obtuvieron proteínas por Sephadex-G-200 entre los tubos 76-115 y por DEAE-celulosa entre los tubos 190-200; las hexosas ocuparon los tubos 12, 64 y 102, en la primera, y los tubos 70, 100 y 150 en la segunda. El Bradford detectó 42 mg/mL de proteínas en **Pa**, mientras que las hexosas eran de 2000 mcg/mL. Se ratifica la composición glucoproteica de **Pa**, y su potencia



inmunogénica.

**\*Evaluación clínica:** los datos estadísticos previos a la **IT**, señalaron para los estornudos un valor de  $1,8 \pm 0,77$ , para la rinohiporrea un valor de  $1,8 \pm 0,4$  y para la obstrucción nasal un valor de  $2 \pm 0,88$ ; después del 1° año de **IT**, los valores **no** fueron estadísticamente significativos (NS). Luego del 2° año de **IT**, se detectaron valores de  $0,6 \pm 0,49$  ( $p < 0,01$ ) para los estornudos, valores de  $0,8 \pm 0,84$  ( $p = 0,01$ ) para la rinorrea y datos de  $0,9 \pm 0,32$  ( $p = 0,01$ ) para la obstrucción nasal. Luego del 3° año de **IT**, se obtuvieron los siguientes valores:  $0,3 \pm 0,48$  ( $p = 0,001$ ) para los estornudos y la rino-hiporrea, y, de  $0,4 \pm 0,51$  ( $p < 0,001$ ) para la obstrucción nasal. Los hallazgos del 4° y 5° años de **IT**, **no** difirieron de los del 3° año, presentando una gran significación ( $p < 0,001$  y  $p = 0,001$ ), las diferentes evaluaciones. <sup>(21-22-23-24-25-26)</sup>

## **Proyecto n° 2: Polen de *Lolium perenne* (Lp)**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**\*Antígeno:** se elaboró en el laboratorio de la División Alergia del Hospital de Clínicas. Los pólenes provistos por Hollister-Stier (Spokane, USA), se extrajeron en buffer salino-fosfato (PBS), por agitación a 4° C, se centrifugaron a 12.500 rpm durante 40 minutos; los extractos clarificados se dializaron en PBS y se esterilizaron con filtros Millipore de 0,22  $\mu$ m. Se trabajó con una mezcla de pólenes de gramíneas compuesta por alícuotas de *Anthoxanthum odoratum*, *Avena fatua*, *Cynodon dactylon*, *Festuca elatior*, *Hordeum vulgare*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis* y *Sorghum vulgare*, y, con el polen de *Lolium perenne* (**Lp**), a una concentración final de 12.000 mcg/mL. Se realizaron controles de esterilidad y se conservaron a -20°C.

**\*Animales de experimentación:** se usaron 5 conejos albinos adultos que fueron inmunizados con el extracto de **Lp**. Se preparó una emulsión de 1 mL compuesta por 0,5 mL de **Lp** más 0,5 mL de adyuvante de Freund completo. A cada conejo se le administró semanalmente 0,20 mL en el dorso rasurado. Diez días después de la última inyección, fueron sangrados “a blanco” por punción cardíaca, y los sueros obtenidos se conservaron a -20°C. <sup>(27-28-29-30-31-32-33)</sup>

**\*Pacientes:** fueron 30 personas con polinosis entre septiembre y diciembre, con historia heredo-familiar de atopía, prueba cutánea positiva  $>5$  mm a Lp y una IgE sérica total superior a 120 KU/L. Eran 13 varones y 17 mujeres, con edades entre los 18 y los 73 años, residentes en la CABA y en el Gran Buenos Aires. Firmaron el consentimiento informado, y no estaban recibiendo inmunoterapia (**IT**) ni tratamiento inmunosupresor de ningún tipo.

Los controles fueron 25 internados en Medicina Interna, no atópicos, sin historia familiar de alergia, con una IgE sérica total  $<50$  KU/L, y sin reactividad cutánea al **Lp**.

**\*Fraccionamiento cromatográfico en columna de Sephadex G-50:** 1,5 mL del extracto de 12.000 mcg/mL se filtró por Sephadex G-50, y se recogió en 40 fracciones. La columna fue de 480 mm x 10 mm y se eluyó con buffer PBS 0,15 M de pH 8 y a 4° C. En alícuotas de 1,5 mL se valoraron proteínas por absorbancia a 280 nm de OD en el espectrofotómetro y a 470 nm de OD para las hexosas por el método del indol. <sup>(34-35-36-37-38-39-40)</sup>

**\*Fraccionamiento cromatográfico en columna de intercambio iónico o de DEAE-celulosa** de 380 mm x 25 mm, con 400 tubos para los eluidos obtenidos con buffer fosfato 0,01 M y de pH 8, con cambios de molaridad de 0,01 a 0,5 M y el pH de 8 a 6.

Se aplicaron las técnicas de Bradford (para proteínas) y del indol (para hexosas).

**\*Pesos moleculares:** marcadores como la albúmina sérica bovina (66 kDa), la albúmina de huevo (45 kDa), la pepsina (34,7 kDa), el tripsinógeno (24 kDa), la  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa), y, la lisozima (14,3 kDa) se filtraron por Sephadex G-50 a razón de 13.500 mcg en 1,5 mL. Se leyó en el espectrofotómetro a 280 nm OD.

**\*Técnicas inmunológicas:** los extractos fueron testificados contra el suero de conejo anti-**Lp** por Ouchterlony (doble difusión en agar), Boyden (hemaglutinación pasiva) e inmunoelectroforesis para valorar su antigenicidad en los animales.

**\*SDS-PAGE y electroforesis bidimensional:** 400 mg de **Lp** se incubaron 16 hs a 4° C con 4mL de solución salina (0,85 % p/v NaOH, pH 7,5), y luego 2 hs más a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4000 g por 30 min y el sobrenadante dializado con agua destilada por 16 hs a 4°C se filtró por membrana de 0,22 µm. La electroforesis en una dimensión se corrió en gel de poliacrilamida al 15 %, con 10 mcL de **Lp** (12 mcg), y se tiñó con azul de Coomassie R-250.

Para las 2 dimensiones, el **Lp** se disolvió en urea 8 M, Tritón X-100 al 2 %, anfolitos 5/7 al 1,6 % y anfolitos 3/10 al 0,4 %. La corrida se hizo en un Mini-Protean II (Bio-Rad), con una solución catódica 100 mM NaOH, y como anódica 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Se sometió a 750 V por 4,5 hs, y para eliminar la urea se empleó 62 mM Tris-HCl, 10 % glicerol, 2,3 % SDS, azul de bromofenol, pH 6,8.

**\*Inmunotransferencia:** las proteínas del SDS-PAGE se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa, se colocaron por 90 min en TRIS-buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6 con 3 % de leche descremada en polvo), se incubaron con suero de conejo anti-**Lp** 1/100, por un lado, y otras, con sueros humanos atópicos 1/10, por la noche a 4° C. Las primeras, se incubaron con una IgG de cabra anti-conejo 1/2000 conjugada con fosfatasa alcalina por 90 min, y las segundas, con una anti-IgE-humana de cabra 1/1000, marcada con peroxidasa. Se revelaron con 4-cloro-1-naftol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS metanol.

**\*Métodos radioinmunológicos:** el PRIST para los valores de la IgE sérica total, y el RAST para las IgE e IgG específicas anti-**Lp**. El PRIST se midió en KU/L y el RAST-IgE en PRU/mL, mientras que el RAST-IgG anti-**Lp**, anti-F33 y anti-F38, se midió en KU/L. El RAST-anti-**Lp** y anti-fracciones 33 y 38, se hizo por la unión covalente a pH 11 en discos Whatman n° 1 con bromuro de cianógeno.

**\*RAST-inhibición:** valora la especificidad de la IgE-anti-**Lp**, con otros antígenos no relacionados con **Lp**, como fue la **Pa**, los epitelios de gato y de perro y el hongo anemófilo *Alternaria alternata*. Con pasos metodológicos similares a los anteriores, la conclusión reveló un 100% de especificidad inmune.

**\*Determinación de los valores de las IL-2, IL-4 e IL-4R por ELISA:** estas citoquinas se detectaron con igual procedimiento que el de la **Pa**.

**\*Pruebas cutáneas:** los extractos de las gramíneas (1/100), **Lp** (1/100), y sus 14 fracciones, esterilizados por Millipore (0,22 µM), se inyectaron en la cara externa del brazo, con los controles de histamina (1/1000), solución fisiológica estéril y buffer fosfato (pH 7) con material descartable. Las proteínas y hexosas sumaban 120 mcg/mL.

Se leyó a los 20 min cuando la histamina logró su máximo de eritema-pápula, y las realizó el mismo profesional en horas de la mañana.

**\*Inmunoterapia (IT):** los 30 polínicos constituyeron 3 grupos de 10 pacientes cada uno: **(A):** recibieron **Lp** total; **(B):** recibieron fracción SP-33 (F 33) y el **(C):** recibió fracción DP-38 (F 38). Se inocularon semanalmente, desde 0,05 hasta 0,50 mL, por vía subcutánea en el brazo, comenzando con 6 mcg de cada alérgeno hasta llegar a 100 mcg, totalizando 15.600 mcg por persona. Luego de cada inyección, permanecieron 30 minutos en el consultorio en observación y prevención de una reacción adversa.

**\*Análisis estadístico:** con la t de Student y el análisis de la varianza. La p<0,05 fue significativa.

## **RESULTADOS**

**\*Fraccionamiento por Sephadex G-50:** se lograron 3 picos proteicos, (tubos 13, 28 y 33), por absorbancia a 280 nm de DO y 3 picos de hexosas (tubos 2, 8 y 16), a 470 nm de DO, por el método del indol.

**\*Fraccionamiento por DEAE-celulosa:** se observan 4 picos proteicos (tubos 25, 38, 55 y 359), a 280 nm de absorbancia, con cambios de molaridad y pH. Se detectan 7 picos de hexosas (tubos 30, 56, 93, 192, 215, 281 y 360), a 470 nm de DO.

**\*Determinación cuantitativa de proteínas:** Lp concentrado: 12.000 mcg/mL; Sephadex G-50: tubo 13: 50 mcg/mL; tubo 28: 150 mcg/mL; tubo 33: 2500 mcg/mL; DEAE-celulosa: tubo 25: 75 mcg/mL; tubo 38: 4500 mcg/mL; tubo 55: 200 mcg/mL y tubo 359: 125 mcg/mL.

**\*Determinación cuantitativa de hexosas:** extracto de Lp: 1400 mcg/mL %; Sephadex G-50, tubo n° 2: 60 mcg/mL %; tubo n° 8: 90 mcg/mL %; tubo n° 16: 120 mcg/mL %; DEAE-celulosa, tubo n° 30: 90 mcg/mL %; tubo n° 56: 180 mcg/mL %; tubo n° 93: 40 mcg/mL %; tubo n° 192: 150 mcg/mL %; tubo n° 215: 120 mcg/mL %; tubo n° 281: 90 mcg/mL % y tubo n° 360: 80 mcg/mL %.

**\*Pesos moleculares:** por las bandas de precipitación por las inmuno-difusiones la albúmina sérica bovina/anti-albúmina sérica bovina, por un lado, y, el anti-Lp de conejo/fracciones 13, 28 y 33, y su transporte a una escala semi-logarítmica con el volumen de elución en la abscisa, el valor para el tubo n° 13 fue de 68 kDa, para el n° 28 de 25,5 kDa y para el n° 33 de 18 kDa.

**\*Técnicas inmunológicas:** el Ouchterlony reveló bandas de precipitación entre el anti-Lp de conejo y el extracto de gramíneas, 2 con el Lp y la fracción n° 38, y una con las n° 33 y 55. Los sueros humanos fueron negativos.

Análogo resultado se obtuvo con la inmuno-electroforesis. La electroforesis unidimensional del Lp en SDS-PAGE al 15% visualizó varias bandas entre los 19 y 97 kDa. En la bi-dimensional, se vieron 5 manchas o "spots" mayoritarios. El spot 1 presentó 48,6 kDa con un pI de 3; los spots 2, 3 y 4 poseían 31,5 kDa, y podrían ser isoformas de una proteína, con un pI entre 9 y 10; el spot 5, reveló 21,8 kDa y se halló en la zona básica. La inmuno-transferencia del anti-Lp exhibió bandas entre los 28 y 97 kDa, siendo las más importantes las de 37 y 40 kDa y 45 y 60 kDa, mientras que otras lo hicieron entre 90 y 95 kDa.

Los sueros humanos anti-Lp revelados con una anti-IgE de cabra, mostró bandas entre los 29 y 97 kDa, las más significativas entre los 37 y 40 kDa, y entre los 45 y 60 kDa. Otras menos importantes se situaron entre 90 y 95 kDa.

**\*Métodos radioinmunológicos:** en el grupo control la IgE sérica total fue de 13 a 68 KU/L, mientras que los atópicos tuvieron entre 90 y 1250 KU/L, con un promedio de 472 KU/L. La IgE-anti-Lp fue de clase 0 en el control, y para los atópicos de clase 0 en 11 pacientes, de clase 1 en 11 y de clase 2 en 8 pacientes.

La IgE mono-específica reveló valores significativos para las fracciones SP-33, DP-38, DH-56 y DH-192.

La IgG-anti-Lp tuvo en los atópicos un  $\bar{x}$  de 391,4 KU/L, y en el control no superó 50 KU/L.

Las citoquinas IL-2, IL-4 e IL-4R, descendieron desde el 2° año de IT, y en el 5° año, la significación fue de una  $p < 0,02$  para la IL-2, una  $p < 0,01$  para la IL-4 y una  $p < 0,001$  para el IL-4R.

**\*Pruebas cutáneas:** los controles fueron negativos para todos los alérgenos. Los atópicos presentaron reacciones de eritema-pápula mayor de 5 mm con la mezcla de gramíneas, 1/100, Lp 1/100, las fracciones SP-33, DP-38, y DH-56, 192 y 360.

**\*Inmunoterapia (IT):** en los grupos A, B y C, descendió la IgE – anti-Lp al cabo de los 5 años. La IgG-anti-Lp, se incrementó en todos los grupos.

En el grupo A, la IT con Lp descendió la IgE-PRIST de 495 a 290 KU/L ( $p=0,20$ ); en los grupos B (SP-33) y C (DP-38), desde 401 KU/L pasó a 240 KU/L ( $p=0,20$ ) y desde 520 KU/L bajó a 235 KU/L ( $p=0,20$ ).

El grupo A vacunado con Lp mostró el descenso de la IgE-anti-Lp desde 0,99 PRU/mL a 0,23 PRU/mL ( $p < 0,05$ ) y un ascenso de la IgG-anti-Lp desde 379 KU/L hasta 940 KU/L ( $p = 0,10$ ), con mejoría sintomática correlativa. El grupo B, vacunado con SP-33 mostró un descenso de la IgE-anti-Lp de 1,34 PRU/mL a 0,40 PRU/mL ( $p < 0,01$ ), y de la IgE-anti-SP-33 de 0,44 PRU/mL a 0,12 PRU/mL ( $p < 0,01$ ), mientras que la IgG-anti-Lp ascendió de 418 KU/L a 970 KU/L ( $p = 0,10$ ) y la IgG-anti-SP-33 desde 132 KU/L a 503 KU/L ( $p < 0,05$ ). El grupo C

vacunado con DP-38 mostró un descenso de la IgE-anti-Lp desde 1,02 PRU/mL a 0,29 PRU/mL ( $p = 0,10$ ), y de la IgE-anti-DP-38 desde 0,66 PRU/mL a 0,21 PRU/mL ( $p < 0,05$ ), mientras que la IgG-anti-Lp ascendió desde 377 KU/L hasta 960 KU/L ( $p = 0,10$ ) y la IgG-anti-DP-38 desde 114 KU/L hasta 444 KU/L ( $p < 0,05$ ). (41-42-43-44-45)

**\*Determinación de los valores de las IL-2, IL-4 e IL-4R después de la IT:** los valores basales fueron: para el **grupo A**, IL-2 de  $172 \pm 110$  UI/mL; IL-4 de  $230 \pm 110$  UI/mL e IL-4R de  $2500 \pm 400$  c.p.m; el **grupo B**: IL-2 de  $190 \pm 120$  UI/mL; IL-4 de  $265 \pm 100$  UI/mL e IL-4R de  $3000 \pm 600$  c.p.m, y, el **grupo C**: IL-2:  $250 \pm 105$  UI/mL, IL-4 de  $255 \pm 90$  e IL-4R:  $3000 \pm 650$  c.p.m. Al cabo de los 5 años consecutivos de IT, se lograron estos valores con su significación estadística: el **grupo A**: la IL-2 de  $100 \pm 60$  UI/mL; la IL-4 de  $120 \pm 60$  UI/mL y el IL-4R de  $2000 \pm 200$  c.p.m. con una  $p < 0,05$ ; el **grupo B**: la IL-2 de  $160 \pm 90$  UI/mL; la IL-4 de  $100 \pm 60$  UI/mL y el IL-4R de  $1200 \pm 250$  c.p.m. con una  $p < 0,001$  y el **grupo C**: la IL-2 de  $180 \pm 80$  UI/mL; la IL-4 de  $120 \pm 75$  UI/mL, y el IL-4R de  $1200 \pm 400$  c.p.m., con una  $p < 0,001$ .

### **Proyecto n° 3: Hongo anemófilo Bipolaris australiensis (Ba)**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**\*Antígeno:** Ba es un hongo ambiental, teleomorfo, llamado también Cochliobolus sp, con colonias de rápido crecimiento, difusas, de color gris a marrón negruzco, cuya imagen inversa es flocoso de color negro. La microscopía muestra el desarrollo de color marrón claro pigmentado, pseudoseptante con conidios geniculados o en zig-zag del talo. Los conidios son producidos a través de poros en la pared del conidióforo (poro-conidia) y son rectos, fusiformes o elipsoidales, redondeados en ambos extremos, lisos a finamente rugosos y con germinación solo en los extremos (bipolar). El género Bipolaris contiene cerca de 45 especies que son, sobre todo, subtropicales y parásitos de plantas tropicales, sin embargo, varias especies, en particular Ba, B. hawaiiensis y B. spicifera, están bien documentados como patógenos humanos. Las manifestaciones clínicas incluyen la queratitis micótica, la feohifomicosis subcutánea y sinusal, la peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatoria y en infecciones cerebrales, tanto en normales como en inmunosuprimidos.

Drechslera, Bipolaris, Curvularia y Exserobolus están relacionados y la diferenciación de los géneros se basa en una combinación de caracteres incluyendo la forma de los conidios, la presencia o ausencia de un hilo que sobresale, el contorno de la porción basal del conidio y su hilo, y, en la secuencia y la localización de los septos.

Se han descrito casos de infecciones importantes en inmuno-suprimidos y en atópicos, como la sinusitis alérgica fúngica (SAF). (46-47-48-49-50-51-52)

El **antígeno** que se empleó fue preparado según la metodología de Frugoni y Hansen en su texto clásico. Su contenido proteico por el Bradford fue de 13 mg/mL y la detección de hexosas también fue positiva por el método del indol, lo cual permite sospechar la presencia de glicoproteínas.

**\*Pacientes:** se estudiaron 12 varones derivados de la Cátedra de Otorrinolaringología, con edades entre los 22 y 39 años, con el diagnóstico de SAF, corroborado por los estudios especializados y por el cultivo micológico. Todos ellos eran atópicos, con historia heredo-familiar, y con una IgE- sérica total (PRIST) elevada de  $230,50 \pm 115,39$  KU/L. Padeían una rinitis crónica, que trataban con aerosoles descongestivos o fármacos antihistamínicos anti-H1 con y sin vasoconstrictores.

Ninguno padecía de asma bronquial. No empleaban otros fármacos, no eran fumadores, y firmaron el consentimiento informado requerido. (53-54-55-56-57)

**\*Pruebas cutáneas:** se realizaron micropápulas de 0,025 mL, con alérgenos ubicuos del hábitat, y el extracto de Ba, con lectura a los 20 min, y controles de histamina 1/1000 y solución fisiológica pH 7,2. Fueron realizadas por el mismo profesional y en horas de la mañana. Los 12 pacientes resultaron positivos ( $> 20$  mm), al extracto de Ba. Ninguno sufrió una reacción

adversa.

**\*Métodos radioinmunológicos:** la IgE-sérica total (PRIST) se midió en condiciones basales, y luego de cada año de **IT** hasta los 5 años, y se midió en KU/L; la IgE-anti-**Ba**, y la IgG-anti-**Ba**, se midieron por RAST, desde el inicio de la **IT** hasta los 5 años de la misma, y se midieron en PRU/mL (Phadebas Rast Units), en clases de 0-0,35; 0,35-0,70; 0,70-3,50; 3,50-17; 17-50 y 50-100, y más de 100 PRU/mL.

**\*Inmunoterapia (IT):** al poseer una IgE-anti-**Ba**, pruebas cutáneas positivas al **Ba**, y la SAF, se le propuso la **IT** para valorar su incidencia en su evolución clínica.

De los 12 pacientes, 5 de ellos NO aceptaron la **IT**, por razones laborales, de distancia y de escasa credibilidad en la misma, por lo cual se comportaron como un grupo control atópico sin **IT**, que aceptaron dado que debían concurrir para su control periódico. Así, los 7 que aceptaron la **IT**, recibieron dosis semanales del extracto de **Ba** por vía subcutánea en el brazo, desde una dilución 1/100.000 hasta la de 1/10 a lo largo de los 5 años programados.

Los que NO hicieron vacunoterapia, realizaron tratamiento sintomático para su rinitis perenne, y, eventualmente, instilación de los senos paranasales con anfotericina-B o itraconazol, según la evolución de su SAF.

## **RESULTADOS**

Los 7 pacientes vacunados, sin medicación anti-fúngica, solo recibieron tratamiento sintomático para su rinitis crónica. Iniciaron la **IT** con **Ba**, y eran controlados en el acto de su vacunación, por posibles reacciones locales y/o generales. Las modificaciones de los valores séricos de las IgE e IgG específicas anti-**Ba**, obtenidos por los métodos radio-inmunológicos, se consignan en las Tablas 1 y 2. Se advierte que la IgE-anti-**Ba** en el grupo vacunado experimentó cambios significativos, ya que, antes de la vacunación sus valores eran de  $0,985 \pm 0,455$ , y que después de la vacunación dichos valores fueron de  $0,29 \pm 0,165$ , donde la  $p < 0,02$ . En los NO vacunados, los dosajes de las IgE-anti-**Ba**, sufrieron escasas modificaciones pues de valores iniciales de  $1,02 \pm 0,327$  a los 5 años se detectaron  $1,12 \pm 0,318$  con una  $p = 0,50$ , no significativa.

El dosaje por ELISA de las IL-2, IL-4 e IL-4R, del grupo vacunado por 5 años, fue concordante con el descenso de la IgE-anti-**Ba**, y, el ascenso de la IgG-anti-**Ba**, como un índice más de la actividad de la **IT** sobre el sistema inmune del atópico, induciendo una “reeducación” del mismo. La IL-2 descendió hasta valores con una  $p < 0,02$  respecto al basal, la IL-4 mostró una  $p < 0,01$ , y, el receptor IL-4R tuvo un descenso  $p < 0,001$ , lo cual lleva a sospechar que su funcionalidad se halla disminuida por menor estímulo de la IL-4.

El grupo que NO recibió **IT** solo mostró ligeros cambios en los niveles de las citoquinas, pero cuya significación fue una  $p = 0,50$ , independientemente de los tratamientos otorrinolaringológicos recibidos.

La **IT** modificó la IgG-anti-**Ba** en los 7 pacientes, de la siguiente forma:

paciente n° 1: basal 50 UI/ml asciende a los 5 años a 150 UI/ml;

paciente n° 2: basal 44 UI/ml, a los 5 años: 280 UI/ml;

paciente n° 3: basal 32 UI/ml, a los 5 años: 350 UI/ml;

paciente n° 4: basal 68 UI/ml, a los 5 años: 190 UI/ml;

paciente n° 5: basal 12 UI/ml, a los 5 años: 170 KU/ml ;

paciente n° 6: basal 24 UI/ml, a los 5 años: 140 UI/ml, y,

paciente n° 7: 28 UI/ml, a los 5 años: 235 UI/ml.

La estadística señala que la IgG- anti-**Ba** del grupo vacunado muestra  $36,85 \pm 18,61$  UI/ml como valores basales y  $216,42$  UI/ml  $\pm 76,34$  UI/ml a los 5 años, con una  $p < 0,001$ .

Con respecto al grupo NO vacunados con **Ba**, los valores son: paciente n° 8: basal 33 UI/ml y para los 5 años: 40 UI/ml; paciente n° 9: basal 100 UI/ml y a los 5 años: 140 UI/ml; paciente n° 10: 20 UI/ml, y a los 5 años, 30 UI/ml; paciente n° 11: basal 40 UI/ml y a los 5 años, 50 UI/ml,

y, paciente n° 12 tuvo un basal de 50 UI/ml y a los 5 años tuvo 70 UI/ml.

La estadística señaló que la IgG-anti-**Ba** de los NO vacunados, NO mostró cambios, dado que los valores iniciales eran  $48,6 \pm 30,73$  UI/ml, y, a los 5 años:  $66 \pm 43,93$  UI/ml, con una  $p = 0,50$ . La SAF es una entidad clínica novel que aqueja a los sujetos atópicos sanos, mientras que, pacientes inmunocomprometidos sufren serias micosis en los senos paranasales y cavidades anexas. Publicaciones previas probaron la participación de varios hongos anemófilos en la patología broncopulmonar; así, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus nigricans*, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*, *Absidia* sp., entre otros, se vincularon con inflamaciones e infecciones crónicas del árbol respiratorio. Realizamos una modesta experiencia en cobayos y valoramos la capacidad de **Ba** para inducir una inflamación crónica de la mucosa respiratoria debida a los componentes metabólicos del hongo (p.ejem. proteasas), y no a la presencia del mismo, tal como se demostró en la ABPA con las enzimas del *Aspergillus fumigatus*. Estos péptidos, se comportan a su vez, tanto en animales como en los humanos, como potentes antígenos promoviendo una respuesta inmune específica, con anticuerpos, citoquinas e infiltrados celulares macrófago-linfocito dependientes. La síntesis de la IgE podría coadyuvar en el empeoramiento de la inflamación, no obstante no detectarse mastocitos en las histopatologías estudiadas. La presencia de la IgG estimularía a los macrófagos a través de su RFc- $\gamma$ , aunque la respuesta inmune es típicamente del tipo IV de Gell & Coombs, con sus variantes IV-a, IV-b, IV-c y IV-d. El empleo de anticuerpos anti-CD4+ y anti-CD8+ ratificó la abundancia de ambas poblaciones linfocitarias.

## DISCUSIÓN

Se presentan 3 modelos humanos de hipersensibilidad a alérgenos del hábitat. Todos ellos eran enfermedades respiratorias **atópicas**, cuyas bases genéticas fueron expuestas. Esta inflamación crónica de la mucosa respiratoria, posee numerosas formas de tratamiento, alivio y mejoría, modificando el infiltrado celular, y los factores que de él dependen. Aquí, exponemos los datos hallados al emplear una forma de terapia inmunológica, como es la vacunoterapia con alérgenos, o **inmunoterapia (IT)**, que se aplica desde Noon y Freeman, en 1911.

Creemos que la **IT** es algo más que un tratamiento exitoso, y que “reeduca” a las células involucradas en esta patología, y, que es una forma **epigenética** de devolverle la “normalidad” a ese genoma, sin alterar su constitución intrínseca, pero modificando el comportamiento de alguno de los elementos constitutivos del núcleo celular, que “silenciarían” por un tiempo poco definido aún, el erróneo comportamiento de los genes de los atópicos y su incesante lucha contra un medio-ambiental “hostil” por las partículas (glicoproteicas) de muy variados orígenes que lo acosan.

La **inmunoterapia** significa la readaptación del atópico a una mejor calidad de vida casi similar a la del no-atópico, y se constituye así, hasta ahora, en el único tratamiento posible, accesible, y que, requiere mucha más investigación acerca de la mejor vía de administración (subcutánea, oral, sublingual, por aerosol), tal como lo manifestó en 1998, la **OMS** en su Informe Técnico sobre **Inmunoterapia en Alergia**.

Será de trascendental importancia el poder vincular las modificaciones citológicas, los valores de las IgE e IgG, y de las IL-2, IL-4 e IL-4R, antes y después de la **inmunoterapia**, con los cambios del ADN y sus posibles metilaciones, u otros cambios fisicoquímicos en las histonas y enzimas que intervienen, al igual que en los ARNi y ARNm, detectando secuencias metiladas en los genes, así como, inhibición de las kinasas dependientes de las ciclinas p15, p16 y RASSF1A. La **inmunoterapia** subcutánea al incentivar a las poblaciones linfoideas residentes en los ganglios linfáticos regionales desencadena un mecanismo de procesamiento y presentación antigénicos, que induce a las células dendríticas, a los LT-CD4, LT-CD8 y LT-Reg, así como, a los LB y a los plasmocitos, a desarrollar una respuesta inmune específica contra el alérgeno, pero que, al cabo de cierto tiempo de reiteración, le provoca cambios sub-

celulares poco conocidos, modificando su estrategia original regida por el código atópico, en un activo mecanismo para contrarrestar los efectos deletéreos del alérgeno en el organismo (mucosa respiratoria en estos 3 casos). Esta presión, éticamente aceptable, que desde el exterior ejercemos sobre el sistema inmune del atópico con el propósito de mejorar su condición clínica, creemos que es una forma de **epigenética** para el atópico, y aún para sus descendientes, basados en los hallazgos de aquella en la embriogénesis humana. (57-58-59-60-61-62)

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Kaminker P.: Epigenética, ciencia de la adaptación biológica heredable. Arch. Argent. Pediatr., 2007; 105 (6): 529-531.
2. González S.J., Cristiano E., Argibay P.: Epigenética y epigenoma. Medicina (Bs.As.), 2011; 71 (4): 89-95.
3. Alonso A., Albónico J.F., Scavini L.M., Rodríguez S.M., Pionetti C.H.: Immunochemical properties of the antigens of Periplaneta americana. Allergol et Immunopathol., 1987; 15: 109-115.
4. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H.: Interstitial pneumonitis induced in guinea pigs by the antigens of Periplaneta Americana. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1992; 2: 263-267.
5. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H.: Immunological changes during cockroach immunotherapy. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1999; 9: 299-304.
6. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K.: Cross reactivity between the antigens of Periplaneta americana and Triatoma infestans. J. Invest. Allergol Clin Immunol., 1996; 6: 301-306.
7. Arruda L.K.: Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins as a cause of IgE antibody responses. J. Biol. Chem., 1995; 270: 31196-31201.
8. Barret A.J.: Classification of peptidases. Meth. Enzymol., 1994; 244: 1-15.
9. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem., 1976; 72: 248-254.
10. Frugoni C.: Preparación de extractos alérgicos. En: Alergia Clínica. Hansen K. y Werner M. – Salvat, Barcelona, 1970, p.586.
11. Irañeta S.G., Albónico J.F., Alonso A.: Proteinase and gelatinolytic activities of house-dust mite and cockroach extracts. J. Invest. Allergol. Clin Immunol., 1999; 9: 235-240.
12. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685.
13. Towbin H.: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979; 76: 4350-4354.
14. Berger S.L.: An operational definition of epigenetics. Genes Dev., 2009; 23: 781-783.
15. Waddington C.H.: Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1939; 25: 299-307.
16. Garcia Giménez J.L.: Epigenética. La gramática del código genético. Journal of Feelsynapsis. ISSN 2254-3651, 2012; 4: 34-38.
17. Watt W.B.: Adaptive significance of pigment polymorphisms in Colias butterflies. PNAS, 1969; 63 (3): 767-774.
18. Nijhout H.F.: Control mechanisms of polymorphic development in insects. BioScience, 1999; 42: 181-192.
19. Kroon F.J.: Aromatase pathway mediates sex change in each direction. Proceedings Biological Sciences, 2005; 272: 1399-1405.
20. Kucharski R.: Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. Science, 2008; 319: 1827-1830.

21. Black M.P.: Reproduction in context: field testing a lab model of socially controlled sex change in *Lythrypnus dalli*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005; 318: 127-143.
22. Jaenisch R.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Rev.Genet.*, 2003, 33 .245-254.
23. Jirtle R.: Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.*, 2007; 8 (4): 253-262.
24. Ting A.: The cancer epigenome components and functional correlates. *Genes Dev.*, 2006; 20 (23): 3215-3231.
25. Rivenbark A.G.: The use of epigenetic biomarkers for preclinical detection of hepatocellular carcinoma: potential for noninvasive screening of high-risk populations. *Clinical Cancer Research*, 2007; 13: 2309-2312.
26. Emlen D.J.: Integrating development with evolution: a case study with beetle horns. *BioScience*, 2000; 50: 403-418.
27. Mark A.: Targeting epigenetics readers in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012; 367: 647-657.
28. Felsenfeld G.: Controlling the double helix. *Nature*, 2003; 241: 448-453.
29. Adcock I.M.: Epigenetics and airways disease. *Respir. Res.*, 2006; 7: 21-40.
30. Buj R.: Quantification of unmethylated Alu (QUAlu): a tool to assess global hypomethylation in routine clinical samples. *Oncotarget*, 2016: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7233>
31. Bedregal P.: Aportes de la epigenética en la composición del desarrollo del ser humano. *Rev. Med. Chile*, 2010; 138: 366-372.
32. Rico Rosillo G.: Epigenética, medio ambiente y asma. *Revista Alergia México*, 2014; 61: 99-109.
33. Pascual M.: Epigenetic aspects of the allergic diseases. *Front. Biosci*, 2010; 2: 815-824.
34. Sircac G.: Allergic asthma biomarkers using systems approaches. *Front. Genet.*, 2014; 4: 308-320.
35. Brand S.: DNA methylation of Th1/Th2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012; 129: 1602-1610.
36. Abramson M.: Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Am.J.Resp.Crit.Care Med.*, 1995; 151: 969-974.
37. Ansari A.A.: Human immune responsiveness to *Lolium perenne* pollen allergen Lol p III (rye III) is associated with HLA-DR3 and DR5. *Human Immunol.*, 1989; 25:59-69.
38. Ansari A.A.: An investigation of human immune response to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen cytochrome c (Lol p X). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987; 80: 229-234.
39. Ansari A.A.: Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* pollen allergen Lol p II. *J.Biol. Chem.*, 1989; 264: 11181-11188.
40. Armentia A.: Is *Lolium* pollen from an urban environment more allergenic than rural pollen? *Allergol et Immunopathol.*, 2002; 30: 218-224.
41. Blaher B.: Identification of T-cell epitopes of Lol p 9 a major allergen of ryegrass (*Lolium perenne*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996; 98: 124-128.
42. Cabrera A.L.: Flora de la Provincia de Buenos Aires: Gramíneas. Colección Científica del INTA, 1970; IV (II): 1-18.
43. Cottam G.P.: Physicochemical and immunochemical characterization of allergenic proteins from rye grass (*Lolium perenne*) pollen prepared by a rapid and efficient purification method. *Biochem J.*, 1986; 234: 305-310.
44. Foucard T.: Allergen-specific IgE and IgG antibodies in pollen-allergic children given immunotherapy for 2-6 years. *Clin. Allergy*, 1978; 8: 249-255.



45. Guerra F.: Th2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 107: 647-653.
46. Moingeon P.: Specific immunotherapy for common grass pollen allergies: pertinence of a five grass pollen vaccine. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2008; 146 (4): 338-342.
47. Subiza F.J.: Recuento de pólenes. En: *Tratado de Alergología de Pelaez Hernández A. y Davila González I.J.*: Edit. Ergon, 2007; I (23): 415-424.
48. Albónico J.F., Tiraboschi I.N.: La sinusitis fúngica alérgica. En *Temas de Inmunoalergia.*, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 99-14.
49. Campana N.R., Alonso A.: La poliposis endonasal recidivante. En *Temas de Inmunoalergia*, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 57-97.
50. Alonso A., Campana N.R., Albónico J.F., Mouchián K., Kaimen-Maciél I.: Aspectos inflamatorios de la poliposis endonasal recidivante (PENAR). *Prensa méd. argent.*, 2009; 96 (4): 197-205.
51. Clarke S.R.: Allergic fungal sinusitis. *J. La State Med. Soc.*, 1998; 150: (6), 248-252.
52. De Shazo R.D.: Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995; 96: 24-35.
53. Folker R.J.: Treatment of allergic fungal sinusitis: a comparison trial of postoperative immunotherapy with specific fungal antigens. *Laryngoscope*, 1998; 108: 1623-1626.
54. Gourley D.: Bipolaris sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1990; 85: 583-591.
55. Mabry R.L.: Immunotherapy for allergic fungal sinusitis: three years' experience. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.*, 1998; 119: (6): 648-651.
56. Sánchez Sánchez B.: Allergic fungal sinusitis. *Rev. Alergia Mex.*, 1999; 46 (5): 145-150.
57. Shubert M.S.: Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998; 102: 387-394.
58. Alonso A., Albónico J.F., Tiraboschi I.N., Mouchián K., Pionetti C.H., Irañeta S.G., Kaimen-Maciél I.: Patogenia e inmunoterapia en la sinusitis fúngica alérgica (SAF). *Prensa méd. argent.*, 2009; 96 (7): 407-410.
59. Alonso A., Mouchián K., Irañeta S.G., Rodríguez S.R., Albónico J.F.: Utilidad de la vacunoterapia con *Bipolaris australiensis* en la sinusitis alérgica fúngica. *Prensa méd argent*, 2012; 10: 95-104.
60. Alonso A., Iovannitti C., Rodríguez S.R., Mouchián K., Albónico J.F.: Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos por *Bipolaris australiensis*. *Prensa méd argent.*, 2013; 99 (6): 426-431.
61. Alonso A., Rosetti F. A., Rodríguez S.R., Mouchián K., Albónico J.F.: IgE and IgG antibodies against *Bipolaris australiensis* (Ba) in allergic fungal sinusitis. *Clin. Microbiol.*, 2015 4: 204. <http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000204>
62. Mouchián K.: Tesis de Doctorado. Biblioteca de la Facultad de Medicina. "Aislamiento y caracterización de las fracciones antigénicas del polen de la gramínea *Lolium perenne* y su relación con la polinosis". Año 2011.

TABLA 1.

Valores de la IgE sérica total y específica antes y después de la inmunoterapia.

	IgE basal KU/L	IgE-RAST-basal anti-Ba. (PRU/mL)	IgE-RAST-anti-Ba después de 5 años. (PRU/mL).
Pac n°			
1:	130	1,40	0,20
2:	162	0,45	0,10
3:	184	0,65	0,30
4:	220	0,60	0,40
5:	145	1,70	0,35
6:	370	1,10	0,10
7:	135	1,00	0,60

**Grupo Control que no realizó vacunoterapia:**

8:	600	0,90	0,90
9:	120	1,20	1,50
10:	330	0,80	1,20
11:	410	0,70	0,70
12:	280	1,50	1,30

Valor promedio de la IgE sérica total basal de la población estudiada:  
230,50 KU/L con un DE  $\pm$  115,39 KU/L.

IgE específica: grupo vacunado: antes:  $x$ : 0,985 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,455 PRU/mL; después de 5 años:  $x$ : 0,29 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,165 PRU/mL.

$p \leq 0.02$ .

IgE específica: grupo no vacunado: antes:  $x$ : 1,02 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,327

PRU/mL ; después de 5 años:  $x$ : 1,12 PRU/mL con un DE  $\pm$  0,318 PRU/mL.  $p = 0,50$

TABLA 2

Valores de la IgG sérica específica antes y después de la inmunoterapia.

IgG-RAST-basal		IgG-RAST-anti-Ba.
Anti-Ba.		después de 5 años
1:	50	150
2:	44	280
3:	32	350
4:	68	190
5:	12	170
6:	24	140
7:	28	235

Grupo control que no realizó vacunoterapia:

8:	33	40
9:	100	140
10:	20	30
11:	40	50
12:	50	70

IgG-RAST-grupo vacunado: basal:  $x: 36,85$  UI/ml con un  $DE \pm 18,61$  UI/ml ;

A los 5 años:  $x: 216,42$  UI/ml con un  $DE \pm 76,34$  UI/ml ;  $p \leq 0,001$ .

IgG-RAST-grupo no vacunado: basal:  $x: 48,6$  UI/ml con un  $DE \pm 30,73$  UI/ml ;

A los 5 años:  $x: 66$  UI/ml con un  $DE \pm 43,93$  UI/ml ;  $p = 0,50$ .

*Pico proteico de Pa por columna de Sephadex G - 200.*

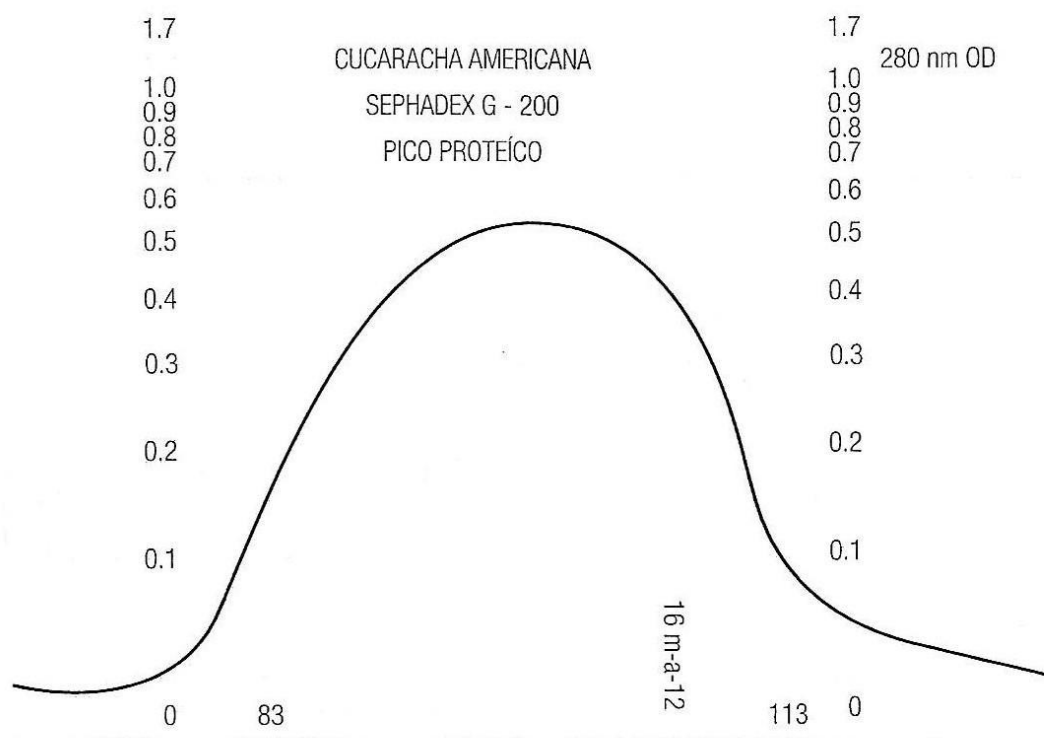


Figura 1

Pico proteico de Pa por DEAE-celulosa.

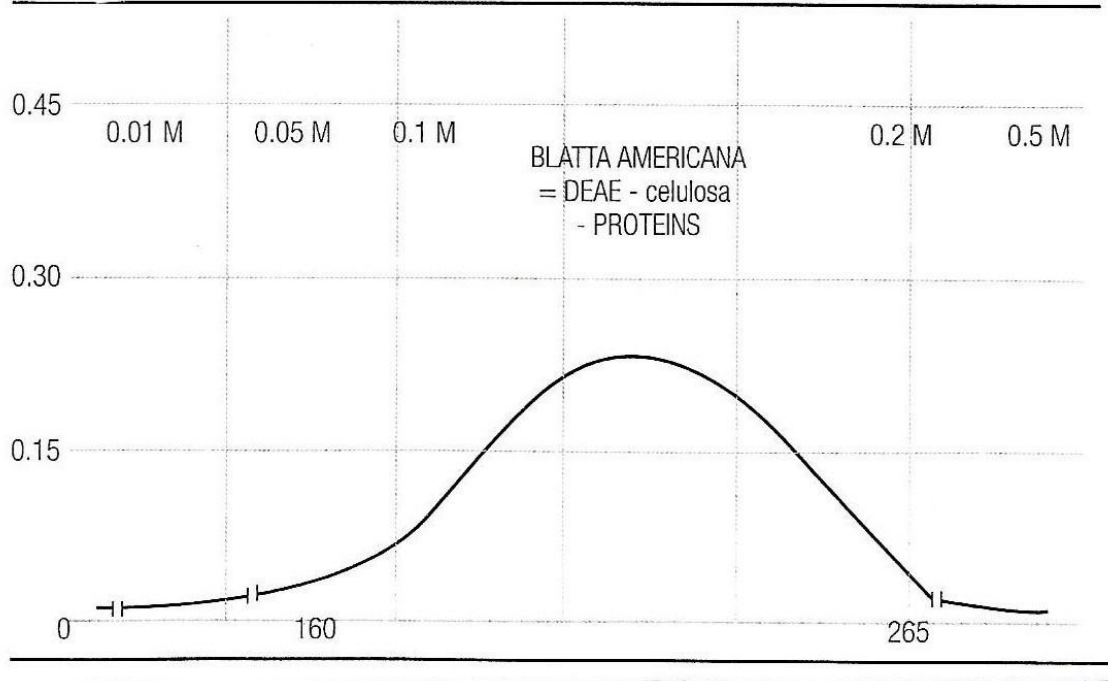


Figura 2

Picos de hexosas de Pa por Sephadex G-200.

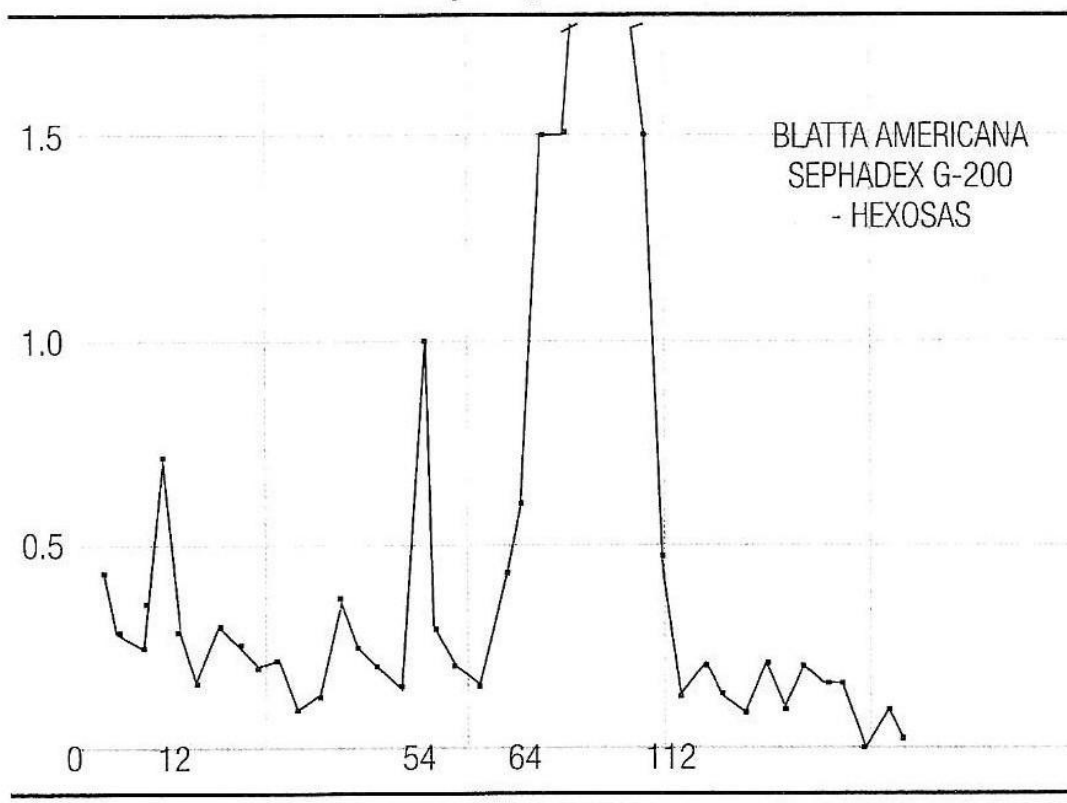


Figura 3

Picos de hexosas por DEAE-celulosa.

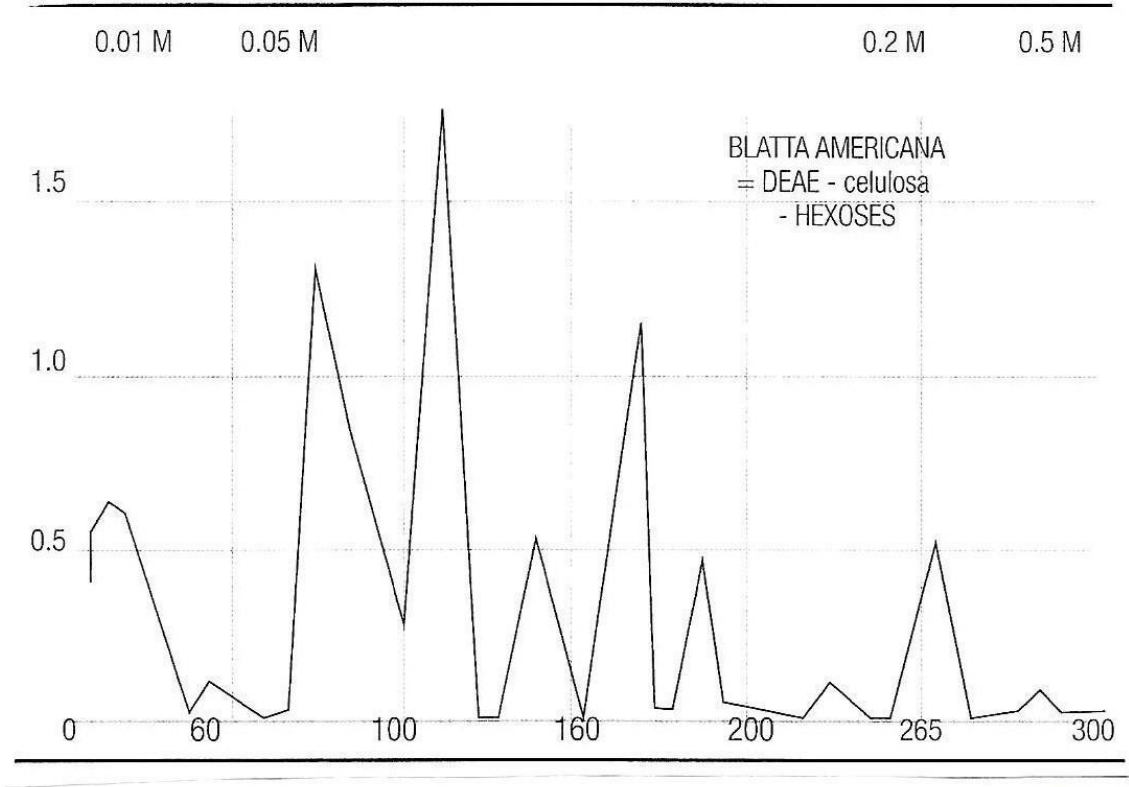


Figura 4

Ouchterlony: P es Pa; G es *Blatta germanica*; S: suero-anti-Pa. Hay identidades entre ambos extractos.

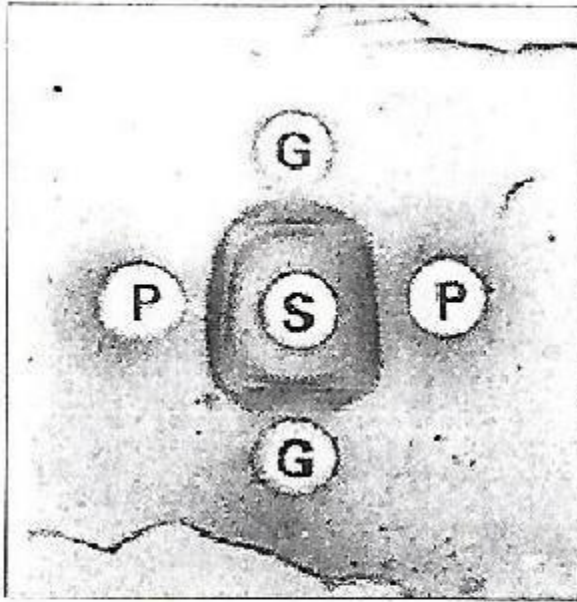


Figura 5

---



*. Pesos moleculares de mar-  
cadores y de Pa.*

---

1. CARBONIC ANHYDRASE
2. ALBUMIN, BOVINE
3. ALCOHOL DEHYDROGENASE
4. AMYLASE
5. APOFERITIN
6. THYROGLOBULIN
7. BLATTA AMERICANA



---

60 100 160 200 260 300

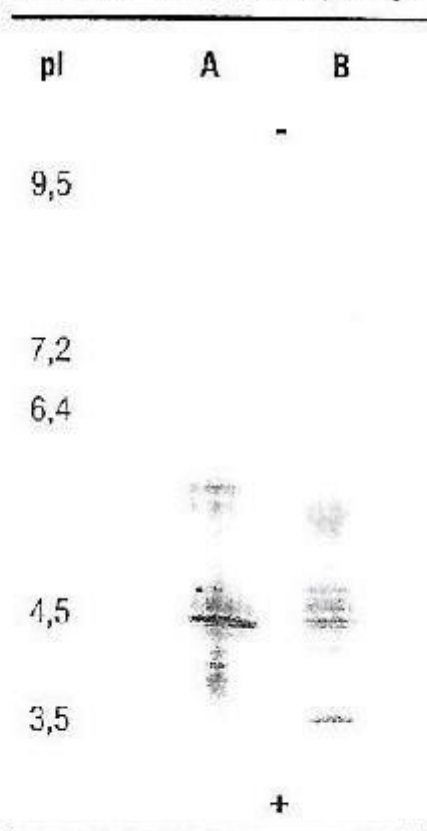
---

Figura 6

---

Figura 7

*Isoelectrofo-  
que entre Ti (A) y Pa (B).  
Bandas comunes a igual pI.*



## Figura 8

*Bandas similares a iguales kDa:  
Electroforesis en gel de  
poliacrilamida de ex-  
tractos de Triatoma in-  
festans (Ti) y Periplaneta  
americana (Pa).*

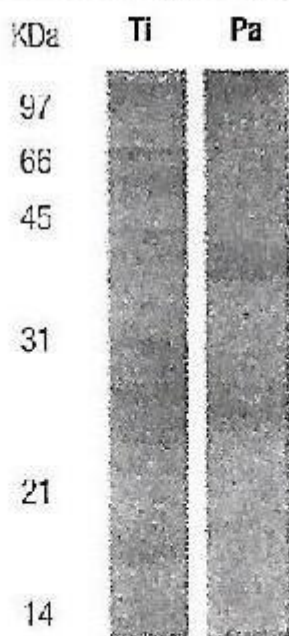
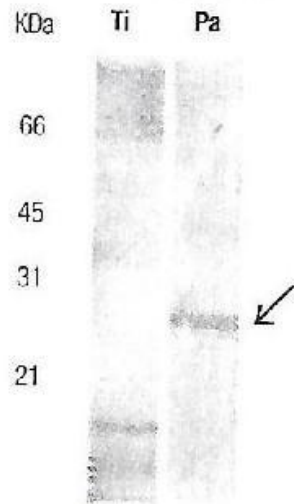


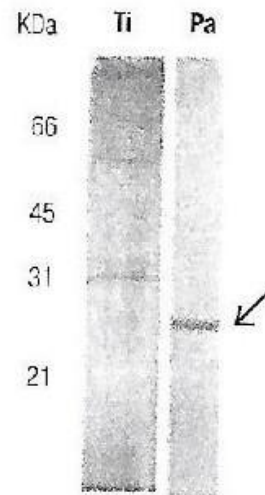
Figura 9

*Bandas detectadas por 2 antisueros diferentes. Ensayos de reactividad cruzada entre los extractos de Triatoma infestans (Ti) y Periplaneta americana (Pa).*

Bandas reconocidas por un antisuero policlonal de conejo anti-Ti



Bandas reconocidas por un suero humano anti-Pa



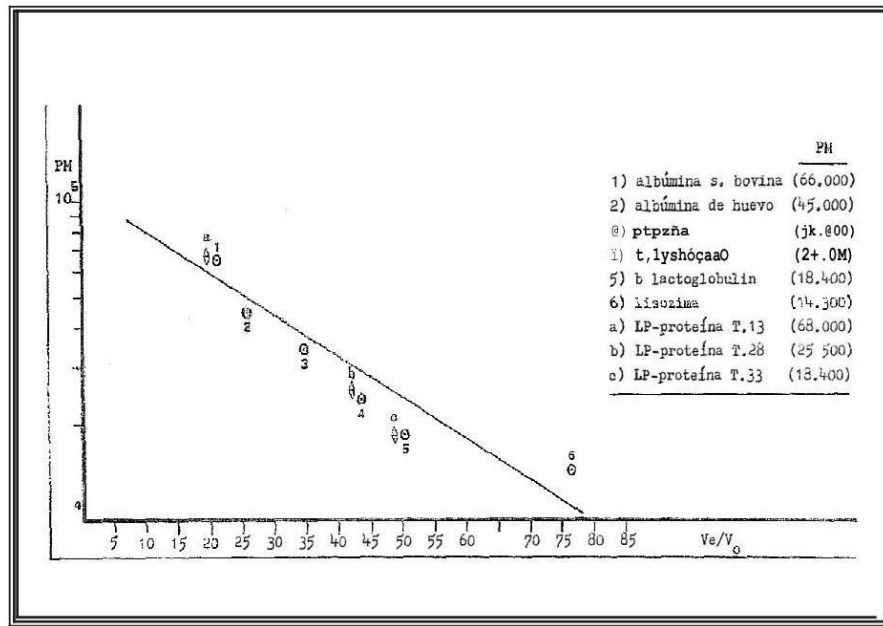


Fig. 10 A

Representación gráfica, en escala semilogarítmica, de los pesos moleculares de los marcadores proteicos y de las proteínas obtenidas por Sephadex con el extracto de Lp. En ordenadas y en abscisas se observan, respectivamente, los pesos moleculares y los volúmenes de elución sobre el volumen muerto.

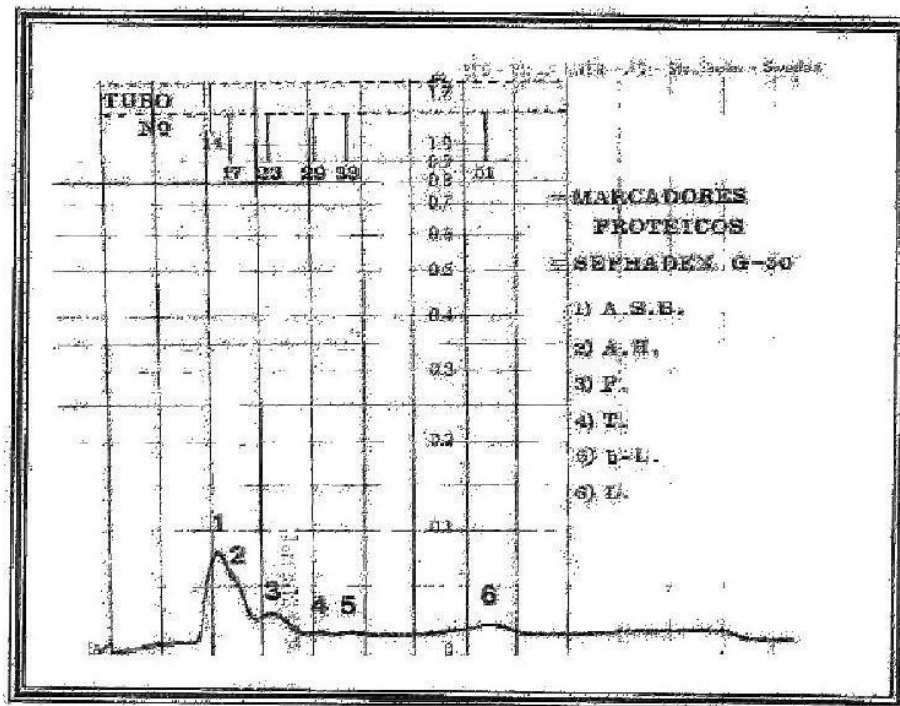


Fig. 10 B

Pasaje de marcadores proteicos por una columna de Sephadex G-50.

- 1) Albúmina sérica bovina: PM 66 kDa
- 2) Albúmina de huevo: PM 45 kDa
- 3) Pepsina: PM 34,7 kDa
- 4) Tripsinógeno: PM 24 kDa
- 5)  $\beta$ -Lactoglobulina: PM 18,4 kDa
- 6) Lisozima: PM 14,3 kDa

## FUNGAL HYPERSENSITIVITY IN NASAL PATHOLOGIES

### Introduction.

Fungi are eukaryotic organisms that cause disease in healthy being preponderant their aggressiveness in immunocompromised patients. Fungal infection of the paranasal sinuses was described many years ago, although it remains a controversial pathology due to its pathogenesis, clinical picture and treatment.

In 1791, Plaigaud described a case of fungal maxillary sinusitis, and in 1893, Mackenzie, did the same by establishing the etiopathogenic discussion. His diagnosis progressed thanks to the advent of computed tomography and endoscopy.

In 1971, Mc Carthy and Pepys observed that 10% of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) had a nasal discharge similar to that produced by the bronchus. 40% of the 111 studied had radiology of maxillary sinusitis and developed *Aspergillus fumigatus* in nasal mucus cultures.

In 1976, Safirstein observed that nasal symptoms in ABPA occurred when receiving treatment with oral corticosteroids. That same year, Young referred to the case of a 15-year-old swimmer with maxillo-ethmoidal sinusitis, nasal polyposis and proptosis of the left eye, and found that this was due to the extension of the fungal material from the sinus to the orbit.

In 1983, Katzentein noted the coexistence of asthma, nasal polyps, sinusitis and a secretion which he called "allergic mucin" in affected sinuses, which was rich in mucin filaments, eosinophils, neutrophils, Charcot-Leyden crystals, and fungal hyphae.

Since 1980, the cases described showed that the fungi of the Dematiaceae family more than *Aspergillus* were those related to fungal allergic sinusitis (SAF). <sup>(1-2-3-4-5-6-7)</sup>.

### Classification and clinical forms.

SAF is a form of sinusitis that both clinically and histopathologically resembles the ABPA and should be distinguished from chronic bacterial forms and other fungal sinusitis.

These are invasive and non-invasive and are subdivided into 4 distinct entities:

- 1): the acute fulminant;
- 2): the indolent chronicle;
- 3): the mycetoma, and
- 4): the SAF itself. <sup>(8-9-10-11-12)</sup>.

1): the **acute fulminant** form is invasive, rapidly progressive and occurs in immunosuppressed by HIV and not by HIV. The fungi are mostly Mucorales (*Rhizopus*, *Mucor* and *Absidia*), but also by the species *Aspergillus*.

The fungus proliferates in the paranasal vessels with ischemic necrosis, mucosal and bone destruction, and hematogenous invasion of the orbit, brain and skin.

It occurs abruptly with fever, pain facial, decreased vision, headache, lethargy and coma. Nasal signs include serosanguinolent mucus, granular with black necrotic plugs in the turbinates and the septum, with nasal or palatine perforation.

Neurological signs indicate poorly prognosis and can lead to death.

The diagnosis is confirmed by the cultivation of the fungus, the histopathology with fungal invasion, necrosis and neutrophilia.

It is treated with necrotic tissue resection, amphotericin B intravenous (0.8 - 1.5 mg / kg / day) and adequate management of the underlying disease.

2): the **indolent chronic** form presents tissue invasion in immunocompetent individuals,

whether atopic or do not. It is slowly progressing as a chronic granulomatous infection that simulates a neof ormation.

Histologically, there is evidence of bone necrosis with a LTCD4-Th1/Th2 infiltrate, plasma cells, neutrophils, eosinophils and Langhans giant cells. In crops, both *Aspergillus* and *Dematiaceae* species are found. It is treated with surgical debridement, tissue and bone removal plus amphotericin B (total dose: 2 g), or ketoconazole (3,3-6,6mg / kg / day) or itraconazole (200/-400 mg / day). It has a good prognosis. <sup>(13-14-15)</sup>.

3): the **mycetoma** caused by *Aspergillus fumigatus* or aspergilloma or "fungus ball", is chronic and non-invasive. They suffer healthy non-atopic. With few symptoms it affects the maxillary antrum. Is a round mass with mycotic hyphae like a wet chalk. It is distinguished from allergic forms by the absence of eosinophils in the nasal mucus. It involves the excision of the fungal mass and the aeration of the breasts endoscopically. Cure in 100% of cases. <sup>(16-17-18-19)</sup>.

4): **SAF**: they are usually adolescents or young adults with a long history of obstruction nasal, rhinohidrorrea and sneezes with poor response to drugs and attempts surgical procedures. Their average age is 27 years ( $8 \pm 31$ ), and they may also suffer postnasal drainage with polypoid formation that is exhibited by the nose. Rarely do they have visual disturbances, proptosis, cranial nerve palsy, epiphora, pain, edema and structural facial alterations (telecantus). Its clinic does not differ from that of perennial or persistent rhinitis.

Physicians at the Children's Hospital of Saint Louis (USA) in 1984 described the case of a girl 10 years old with a painful maxillary and nasal mass that grew and deformed the face nostril affected. It was thought a tumor pathology and after the debridement was made diagnosis of mycosis by the species *Curvularia*. SAF is frequently accompanied by asthma (33-50%) and although the association of SAF with ABPA is not a rule, 10% of the latter have *Aspergillus* in the nasal mucus. There is no association between SAF and hypersensitivity to AINEs. <sup>(20-21-22-23)</sup>.

### **Laboratory findings.**

They have focused on the parameters identified as abnormal in ABPA. These include: elevated eosinophil count, increased serum IgE, specific IgE antibodies, positive skin sensitivity for probably involved fungal antigens, and presence of IgG and specific serum precipitins. Elevated eosinophilia in more than 600 per mm<sup>3</sup> occurs in 50% of patients. Unfortunately, there are no published studies yet linking eosinophil counts to disease development, but it is presumed to fluctuate with eosinophil activity, as in ABPA.

Patients have total serum IgE greater than 100 ng / ml and a subgroup of individuals have elevated levels ( $\geq 1000$  ng / ml). There are positive skin tests and specific IgE antibodies against the culture material of the breasts. It is difficult to diagnose type I hypersensitivity in the form of prick-test or intradermorreaction, as well as RAST (radio-allergo-sorbent-test) to fungal antigens, due to the low viability and standardization of the extracts.

It is common for individuals to have positive skin tests with common aeroallergens of the habitat or anemophilous fungi and RAST equal to class 2 or higher. In some studies, an increase in specific IgG antibodies or the presence of serum precipitins against the fungal antigens involved has been reported. All this led to the development of appropriate witnesses to certify the presence of a specific IgE and / or IgG before and after specific vaccination with *Bipolaris* and *Curvularia* antigens isolated from patient samples and cultured by us in our labs, as well as the proinflammatory cytokine IL-2 and IL-4 dosages and receptor expression for the latter ( IL-4R) before and after immunotherapy by assessing



the biochemical changes induced by it.

Erythrocyte sedimentation is usually within normal ranges. If elevated, it is probably due to concomitant bacterial infection. <sup>(24-25-26-27-28)</sup>

In some studies, the patients were submitted to immunological evaluation including analysis of lymphocyte subpopulations and titration tests of cellular immunity. None presented evidence of immunodeficiency, diabetes or cystic fibrosis.

#### **Mycology:**

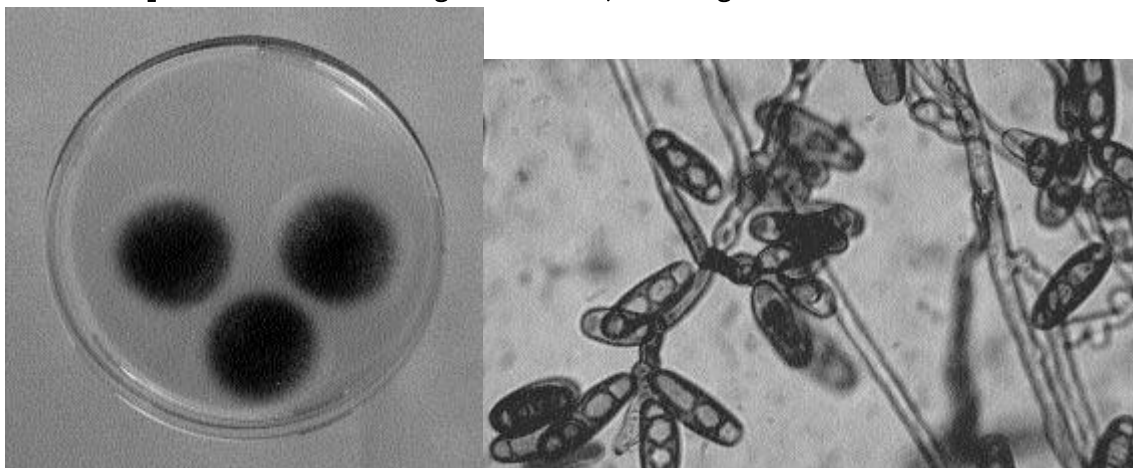
Culture and cytology of the mucus are essential for the diagnosis of certainty of the SAF. The fungi involved are from the family Dematiaceae (formerly Helmintosporium) which include *Bipolaris* sp., *Drechslera* sp., *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Exserohilum* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. and *Chrysosporium* sp.

They are dark pigment fungi typical of the soil, plants, tree trunks and water. They were considered saprophytes and are identified with Gomori's silver-metamine staining being useful neither the May-Grünwald-Giemsa nor the hematoxiline-eosine.

Their slow cultivation makes it difficult to identify them because they can be considered as contamination.

One alternative is in situ hybridization (HIS) that by using known DNA fractions that are bind to a ribosomal RNA sequence of the fungus allows rapid identification.

**If it is not possible to detect fungal elements, the diagnosis can not be confirmed.**



Figs. 1 and 2: Cultivation and microphotography of *Bipolaris australiensis*.

#### **BIPOLARIS AUSTRALIENSIS and other pathological species.**

Teleomorph: *Cochliobolus* sp.

The colonies of this one are of fast growth, diffuse, of gray color to blackish brown, Whose inverse image is flocosa of black color. Microscopic morphology shows the development of pigmented pale brown, pseudoseptant with conidia geniculate or in zig-zag of the thallus. Conidia are produced through pores in the wall of the conidiophore (Poroconidia) and are straight, spindle-shaped or ellipsoidal, rounded at both ends, smooth to finely rough and germinated only at the ends (bipolar).

The genus *Bipolaris* contains about 45 species that are subtropical and parasitic tropical plants, however, several species, in particular *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera* are well documented as human pathogens.

Clinical manifestations include mycotic keratitis, subcutaneous Phaeohyphomycosis, sinusitis, peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD), infections and the widespread Feohifomycosis caused by *Bipolaris* sp. reported in both

normal and immunosuppressed patients.

Drechslera, Bipolaris, Curvularia and Exserohilum are closely related and the differentiation is based on a combination of characters including the conidia, the presence or absence of a protruding thread, the contour of the basal portion of the conidium and its thread, the point at which the tube originates in the germ of the basal cells and, in lower degree, sequence and location of the septa of the first 3 conidia. (29-30-31-32)

1. Colony appearance (on 30° C - Peptone glucose agar):

- Diameter: 80 mm in one week.
- Topography: smooth and extended.
- Texture: from cotton to felt.
- Color: gray-black. A white border is often displayed.
- Reverse: black.

2. Microscopic appearance at 30° C :

- Predominant characteristics: large conidia, oval, of brown color and thick wall, with multiple partitions. They occur in geniculated conidiophores.
- Characteristics of conidia: large, from oval to elliptic, rounded at the ends, 14-40 x 6-11 µm in diameter. 80-90% have 3 partitions, occasionally 4 or 5.

3. Differential diagnosis: with other species of Bipolaris, Exserohilum spp., Alternaria, Curvularia spp. of conidia, size and number of partitions. Exserohilum spp. Is distinguished by its outgoing and truncated thread. Helminthosporium spp. Is similar, but the conidiophores are not geniculate. Drechslera spp. Is also similar, but the conidiophores are not geniculate, it differs because it germinates at right angles to the axis of the spore. Curvularia conidia are curved.

4. Sexual status: Cochliobolus australiensis.

5. Clinical significance: It is a plant pathogen. Some cases of deep infection have been described in immunocompromised patients. Surgical removal of local lesions is important in all forms of pheochromocytoma. Corneal haemophomycosis: topical natamycin. Subcutaneous and sinus phaeohyphomycosis: itraconazole as a complement to surgery. Disseminated pituitary: voriconazole iv. or oral, itraconazole oral solution or amphotericin B-deoxycholate 1-1.5 mg / kg / day or equivalent doses of a lipid formulation. Alternatives: subcutaneous and sinus phaeohyphomycosis: amphotericin B-deoxycholate iv., or voriconazole.

### **Radiological findings.**

If a patient presents a history and clinical suggestion of a chronic inflammatory sinus process with a simple pathological sinus plaque, the sectional image of the TAC may be a chance. Radiology minimizes diagnostic error as descriptive (localization).

The images in the SAF are non-specific: 1): multiple opacification of the paranasal sinuses to unilateral predominance; 2): thickening of the mucosa; 3): thinning of the breast wall and evidence of bone erosion. However, these changes are also observed in other infectious or tumor processes. In the tomography homogenous zones with different patterns can be observed: image of "starry ice" or serpiginous areas, of metallic density. Stamberger and colleagues describe 27 of 59 patients (46%) with metallic images compared to those of a foreign body, on the radiographs of patients diagnosed with SAF, attributed to the presence of phosphate and calcium sulfate in the center of the fungal mass. The presence of different degrees

of bone erosion does not necessarily indicate tissue invasion. However, if the invasion is visible, as in intracerebral abscesses or optic nerve infiltration, they discard the diagnosis of SAF and are suggestive of acute sinusitis.

Nuclear magnetic resonance may be a complement to TAC in select cases that require additional information for an image. The radiologist can give a precise anatomical location, but the pathologist will have the last word.

### **Histopathology:**

The mucoid impaction extracted from the paranasal sinuses was referred to initially as "allergic mucin". It is a thick material, with the consistency of the peanut butter and of yellow, brown or green color. Microscopically, accumulations of necrotic eosinophils and other picnotic cells are observed on a basophilic or eosinophilic amorphous background. Also appear Charcot-Leyden crystals that are hexagonal in the cross-sections or bipyramidal in the longitudinal. The direct visualization of the hyphae is quite rare; Are observed after staining or culture. There should be no evidence of tissue invasion in SAF. In a study conducted in Phoenix, Arizona, by M.Shubert and D. Goetz with 67 patients suffering from allergic fungal sinusitis (the largest population described to date), in eight years of follow-up 4 key points were established to specify the histopathological diagnosis :

1). Allergic mucin, present at the macro and microscopic examination.

A)- Macroscopy reveals black-brown to green material.

B)- Mucin exudate stained with hematoxylin-eosine presents: a pale eosinophilic background, accumulations of picnotic eosinophils and Charcot Leyden crystals.

2). Both of them, too. The staining metamine positive plaque for fungal hyphae, but no hyphae are seen in the mucosa (with or without positive culture). Silver staining negative and positive culture for fungi.

3). A)- Hematoxylin-eosine staining of the sinus mucosa is characteristic for SAF and indistinguishable from the mucosal infiltrate in the asthmatic bronchus. Mucosa with eosinophil infiltrate, plasma cells and small lymphocytes (differential diagnosis with nonallergic eosinophilic rhinitis).

B). Absence of necrosis, granulomatous formation or giant cells.

C). Stromal edema.

D). Thickening of the basement membrane of the respiratory epithelium and partial scaling of respiratory epithelium.

E). Distension of mucous glands.

4). Other fungal diseases are excluded.

**Pathophysiology:** The exact mechanism of SAF is under discussion. Histopathology similar to that of ABPA suggests that inhaled spores are trapped in the mucus where the fungus proliferates by releasing antigens and inducing an inflammatory Type I (IgE-dependent) or type III (Arthus-immune complexes).

With the authors we advocate type I since patients have positive skin tests for fungal antigens and aeroallergens with high total and specific serum IgE. Type III is debatable because the presence of specific IgG and precipitins is not correlated with an Arthus-type histopathology or general findings that justify it (vasculitis) and is the expression of the immune response to the mycotic antigen.

The inflammatory perpetuation by IgE plus cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-13) and locally released chemokines (RANTES) lead to nasal ABPA.

Since mycotic antigens may behave as superantigens, LTCD4-Th1 / Th2 in a HLA context can generate a chronification through the RcT-V $\beta$  in addition to specific IgE with

mastocytosis activation.

**Diagnosis:** based on the ABPA the authors propose these criteria:

- 1): presence of allergic mucin;
- 2): absence of bone or tissue invasion;
- 3): positive cultures for the fungus;
- 4): TAC characteristic of sinusitis;
- 5): immunocompetence;
- 6): nasal polyps;
- 7): atopy;
- 8): precipitins or specific IgG and
- 9): peripheral eosinophilia.

**In our experience we suggest:**

- 1): atopy;
- 2): TAC suggestive of SAF;
- 3): positive fungal culture;
- 4): allergic mucin and
- 5): nasal polyps.

These are the most frequent findings.

#### **MATERIALS AND METHODS.**

**A): Antigens:** extracts prepared by us using at the starting point of the culture of the Mycology Center of the School of Medicine that had been identified as *Bipolaris australiensis*, *Curvularia* and *Alternaria alternata*.

The preparation methodology of the extract was the established by Frugoni and Hansen in their classic text. Their protein contents were determined by the Bradford technique giving a result of 13 mg / ml. An assessment of the presence of hexoses were positive and the antigens responsible for the immune response could be suspected as glycoproteins

**B): Patients:** we studied 12 men derived from the Chair of Otolaryngology (Prof.Dra I.Kaimen-Maciel), aged between 18 and 29 years, with the diagnosis of SAF corroborated by the specialized studies and the mycological culture. All of them were atopic, with a history of hereditary familiar and with a serum IgE total elevation of  $230.50 \pm 115.39$  KU / L.

**C): Skin tests:** in all patients, intradermal reactions were performed on the face of the arm using disposable needles of 13 x 0.4 mm with 0.02 mL with the usual aero-allergens (mites, blattidae, cat and dog epithelia, pollens and anemophilic fungi), among which a marked difference (erythema-papule  $\geq 20$  mm) was found. The extracts of *Bipolaris*, *Curvularia* and *Alternaria* were injected with 8 mcg of pure protein each, sterilized by 0.22  $\mu$  Millipore filters. Controls were physiological solution pH 7.2 and sterile histamine phosphate diluted 1/1000. The reading was performed at 20 minutes measuring the generated erythema and papule. The response was coded as follows: 1 to 4 mm (+); 5 to 9 mm (++); from 10 to 14 mm (+++) and more than 15 mm (++++). The patients remained for 1 hour in observation to assess and control possible adverse systemic reactions in very sensitive subjects. The tests were performed by the morning and by the same person.

**D): Radio and enzyme immunoassays:** total serum IgE was determined by the ELISA following strictly the manufacturer's specifications (Phadebas, Uppsala, Sweden). The results were expressed in KU / L.

In order to dose IgE and specific anti-Bipolaris, anti-Curvularia and anti-Alternaria- IgG, the RAST technique was developed following the steps established by Ceska. The results were expressed in Phadebas RAST Units (PRU / ml), originally in classes 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6, and actually, in their equivalents from 0 to 0.35; 0.35 to 0.70; 0.70 to 3.50; 3.50 to 17; 17 to 50; 50 to 100 and over 100 PRU / ml. IgG was expressed in International Units per milliliter (IU / mL).

Synthetically, the procedure was as follows: the fungi extracts constituted the solid phase covalently attached to the cellulose discs (SS547) with cyanogen bromide at pH 11 for 2 hours in an alkaline medium. The sites of the membranes that did not react were blocked for one hour by a 0.2 mol / L phosphate buffer, pH 7.5, bovine serum albumin to 5% and 2% Tween 20 in distilled water 1/5. They were then washed with 0.01% PBS-Tween and incubated overnight with a 1/8 dilution of patient sera. These reactants were washed with a buffer-blocker and the membranes incubated with 50,000 c.p.m. of anti-IgE (or anti-IgG) -I-<sup>125</sup>. (Pharmacia, Uppsala, Sweden) diluted in 1 mL of the buffer overnight, then washed and their radioactivity was measured in the gamma counter.

Controls of each experience with normal sera were always used. In order to ensure the specificity of the immune response, RAST-Inhibition according to the Gleich technique was applied. In addition to the absorptions of the antibodies with its specific antigen from dilution 10<sup>-6</sup> to the concentrate were used. Other unrelated allergens, such as Lolium, Ambrosia, cat hair and pollens concentrates were used.

Serum dosages of IL-2 and IL-4 were performed with ELISA kits in sera stored at -20 ° C, whereas IL-4R levels were detected by RIA from an antiserum against the CD124 marked by us (kindly supported by Dr. Luis Mario Scavini) with I-<sup>125</sup> following the method of Ceska. The sensitivities of the IL-2 equipment are of the order of 5 pg / mL, for the IL-4 of 1 pg or 10 mUI and for the IL-4R of 7 pg / mL. These devices detect between 0 and 4000 pg / mL of each cytokine and of the receptor (soluble or sIL-2, sIL-4 and sIL-4R forms). The purification of them has minimized the possibility of interference and false positives or negatives. (33-34-35-36-37)

## **RESULTS.**

The 7 patients in the experimental group (vaccinated) discontinued all established medication.

At the time by the specialist (instillation of the sinuses with amphotericin-B or itraconazole). Nasal sprays with vasoconstrictors or corticosteroids were used if respiratory discomfort altered their quality of life. Anti-H1 antihistamines (e.g., loratadine, cetirizine) at the usual therapeutic doses for these cases of respiratory allergy were indicated. They were induced an immunotherapeutic treatment with the extract of Bipolaris, Curvularia and Alternaria with a injection with progressive dilutions of the original extract with 13 mg / mL, starting from a dilution of 1 / 100,000 of that extract to the concentration of 1/10 in the third year. Every year venous blood sample to assess the presence of IgE and IgG isotypes as well as IL-2 and IL-4 cytokines and serum IL-4R.

The remaining 5 patients who refused immunotherapy received only symptomatic treatment with identical drugs, if the respiratory discomfort indicated it. Four of them relapsed their sinusopathy, and the otorhinolaryngologist had to institute local antifungal treatment.

However, they demonstrated their collaboration with the research project, by allowing annually the extraction of a blood sample to assess the presence of antibodies and specific anti-fungal IgG antibodies, and, of the cytokines or IL-4R for compare with samples drawn

from patients in the experimental group.

The patients in the experimental group did not suffer recurrences of their pathology of origin asserted by the consultation with the Otorhinolaryngology Division over the 3 years of immunotherapeutic treatment.

Throughout the 3 years of specific immunotherapy with fungal extracts, serum IgE showed a decrease from 0.985 PRU / mL with an DE  $\pm$  0.455 PRU / mL to values of 0.29 PRU / mL with an DE  $\pm$  0.165 which means a  $p \leq 0.02$  while the control group possessed from 1.02 PRU / mL with an DE  $\pm$  0.327 PRU / mL to 1.12 PRU / mL with an DE  $\pm$  0.318 PRU / mL with a  $p = 0.50$ .

Both IgG-specific-anti-fungal and IL-2 cytokines, IL-4 and IL-4R, showed significant changes in patients vaccinated with a  $p \leq 0.01$  to 0.001 while the unvaccinated group did not reveal changes of significance with a  $p = 0.50$ .

The test of precipitins (Ouchterlony) was negative not evidencing bands of precipitation, speculating that the IgG-anti-fungal detected does not belong to the precipitating antibodies, and, if presumably to the incomplete antibodies of Margni or to the IgG4, both with a possible protective role in the immunotherapy of the atopic as has been revealed in other human experimental models.

Immediate reading skin tests with fungal antigens performed at 3 years, revealed that in patients 1, 2 and 6 were negative while in the other 4 of the group vaccinated were still positive but weaker than the initial ones by measuring erythema and papulae. On the other hand, the patients in the unvaccinated group did not show any change in their local skin reactivity when tested with fungal antigens.

The cellular participation in the clinical improvement is assumed taking into account that, the immunotherapy activation of lymphocyte populations T and B, which, the LT-CD4-Th2 functionality is exacerbated with the production of their cytokines.

The decrease in the serum values of IL-2, IL-4 and IL-4R in this model is auspicious.

Another aspect that should be studied is the role of those metabolic products of the fungus (eg, proteases) that allow its colonization and perpetuation in the mucosa as was demonstrated in many research projects and some with other fungi such as *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus nigricans*.<sup>(35)</sup>

## CONCLUSIONS AND DISCUSSION.

Conventional treatment of SAF is essentially medical.

If there is no tissue or bone invasion and patients do not require antifungal systemic drugs. Although in the ABPA oral antifungal drugs reduce symptoms, in the Dematiaceae conditions are poorly susceptible to itraconazole.

New therapies propose the use of topical or inhaled antifungal agents, as irrigation of the paranasal sinuses with amphotericin B or ketoconazole.

The undisputed step any fundamental is the surgical debridement by endoscopy with removal of the fungal mass and sinus ventilation. The disadvantage is the high percentage of relapses after surgery.

Waxman divided the patients into 3 groups: a): immediate relapse in months; b): the late recurrence in years and c): prolonged remission. In the absence of an indicator that who will be well after the surgery are recommended the inhaled corticosteroids post-operative or orally at the rate of 0.5 mg / kg / day of prednisone for 2 weeks.

This is when it is decided to carry out specific immunotherapy with the mycotic antigen isolated from the patient and properly prepared and standardized for its correct

vaccination.

The literature is contradictory since while Ferguson (1997) desensitized 4 patients they all got worse; Mabry (1998) vaccinated 9 patients and 6 of them improved markedly and did not suffer relapses.

Vaccinotherapy did not produce any adverse effects and allowed the discard of the medication as inhaled corticosteroids.

The prognosis of SAF is variable and the percentage of recurrences after surgery with and without steroids is high (32-100%). Endoscopic surgery of the breasts with aeration, removal of affected tissue, restoration of mucociliary clearance preserving normal anatomy provides immediate improvement of symptoms, but does not guarantee absence of relapses.

Therefore, it is considered that the incorporation of specific immunotherapy in all cases is justified to modify the inflammatory tissue and to avoid or reduce relapses.

SAF is essentially a new atopic allergic entity in which a family of fungi triggers and generates a chronic inflammation that responds to the biochemical patterns of atopics.

It has nothing to do with the other 3 forms of mycosis sinumaxillares described since they are developed in another context and are not producers of a LTC4 / Th2 response but rather than granulomatous and LTC4 / Th1.

Therefore, it is considered necessary to incorporate the extracts of *Bipolaris*, *Drechslera*, *Curvularia* and *Alternaria* to the battery of diagnostic skin tests and to study more deeply those patients that show remarkable skin reactivity to the extracts of the fungi routinely studied.

Our findings resurrect the classic academic controversies related to the role of fungi, bacteria and viruses in the genesis of allergic inflammation on a previous genetic predisposition. - (29).

#### **BIBLIOGRAPHY.**

- 1.- Albónico J.F., Tiraboschi I.N. : "La sinusitis fúngica alérgica". En Temas de Inmunoalergia, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 99-114.
- 2.- Campana N., Alonso A. : "La poliposis endonasal recidivante". En Temas de Inmunoalergia, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 57-97.
- 3.- Alonso A., Campana N.R., Albónico J.F., Mouchián K., Kaimen-Maciel I. : Aspectos inflamatorios de la poliposis endonasal recidivante (PENAR). Prensa méd.argent., 2009 ; 96 (4) : 197-205.
- 4.- Allphin A.L. : Allergic fungal sinusitis : problems in diagnosis and treatment. Laryngoscope, 1991; 101 : 815-820.
- 5.- Bent J.P. : Diagnosis of allergic fungal sinusitis. Otolaryngol. Head Neck Surg., 1994 ; 111 : 580-588.
- 6.- Blitzer A. : Fungal infections of the nose and paranasal sinuses. Otolaryngol. Clin. N. Am., 1993; 26 : 1007-1035.
- 7.- Brandwein M. : Histopathology of sinunasal fungal disease. Otolaryngol. Clin. N. Am., 1993 ; 26 : 949-981.
- 8.- Carter K.D. : Ophthalmic manifestations of allergic fungal sinusitis. Am.J.Ophtalmol,1999; 127: 2, 189-195.
- 9.- Clarke S.R. : Allergic fungal sinusitis. J.La State Med.Soc., 1998; 150 : 6, 248-252.
- 10.- De Shazo R.D. : Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. J.Allergy Clin.Immunol., 1995; 96 : 24-35.

- 11.- Ence B.K. : Allergic fungal sinusitis.  
Am. J. Rhinol., 1990; 4 : 169-173.
- 12.- Folker R.J. : Treatment of allergic fungal sinusitis : a comparison trial of postoperative immunotherapy with specific fungal antigens.  
Laryngoscope, 1998; 108 : 1623-1626.
- 13.- Gourley D. : Allergic Bipolaris sinusitis.  
J.Allergy Clin.Immunol., 1990; 85 : 583-591.
- 14.- Katzenstein A.L. : Allergic Aspergillus sinusitis.  
J. Allergy Clin. Immunol., 1983 ; 72 : 89-93.
- 15.- Mackenzie J.J. : Preliminary report on Aspergillus mycosis of the antrum maxillare.  
J.Hopkins Hospital Bulletin, 1983 ; 4 : 9-10.
- 16.- Mabry R.L. : Immunotherapy for allergic fungal sinusitis : three years'experience.  
Otolaryngol. Head Neck Surg., 1998; 119 : 6, 648-651.
- 17.- Millar J.W. : Allergic aspergillosis of the maxillary sinuses.  
Thorax, 1981 ; 36 : 710-715.
- 18.- Mc Carthy D.S. : Allergic bronchopulmonary aspergillosis.  
Clin . Allergy, 1971 ; 1 : 261-266.
- 19.- Morpeth J.F. : Allergic fungal sinusitis : an update.  
Annals Allergy, Asthma & Immunol., 1996; 76 : 128-136.
- 20.- Mukherji S.F. : Allergic fungal sinusitis.  
Radiology, 1998 ; 207, 2, : 217-222.
- 21.- Muntz H. : Allergic fungal sinusitis in children.  
Otolaryngol. Clin. N.Am., 1996; 29 : 185-191.
- 22.- Nash D.R. : Allergic fungal sinusitis.  
Immunol. Allergy Clin. N. Am., 1998 ; 18 : 695-710.
- 23.- Plaignaud M. : Observation sur un fungus du sinus maxillaire.  
J. Chir (Paris), 1791 ; 1 : 111-116.
- 24.- Sánchez Sánchez B. : Allergic fungal sinusitis.  
Rev. Alerg.Mex., 1999 ; 46 : 5, 145-150.
- 25.- Shubert M.S. : Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis.  
J. Allergy Clin. Immunol., 1998 ; 102 : 387-394.
- 26.- Shubert M.S. : Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis.  
Treatment and follow-up.  
J. Allergy Clin. Immunol., 1998 ; 102 : 395-402.
- 27.- Waxman R. : Allergic aspergillus sinusitis : concepts in diagnosis and treatment.  
Laryngoscope, 1987 ; 97 : 261-266.
- 28.- Shubert M.S. : Medical treatment of allergic fungal sinusitis.  
Annals Allergy, Asthma & Immunol., 2000; 85 : 90-101.
- 29.- Ruiz Moreno G. : Lecciones de Alergia. Edit. López & Etchegoyen.  
Buenos Aires. 1957.
- 30.- Alonso A., Albónico J.F., Tiraboschi N.I., Mouchián K., Pionetti C.H., Irañeta S.G., Kaimen-Maciél I. : Patogenia e inmunoterapia en la sinusitis fúngica alérgica (SAF).  
Prensa méd argent., 2009 ; 96 (7) : 407-410.
- 31.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem., 1976 ; 72: 248-260.
- 32.- Gleich G.J. : The radioallergosorbent test : its present place and future in the practice



- of allergy. *Advances in Asthma and Allergy*, 1975 ; 2 : 1-9.
- 33.- Berrens L. : Possible indirect binding of IgE in house-dust RAST. *Ann.Allergy*, 1979 ; 43 : (1) : 38-45.
- 34.- Gleich G.J. : Measurement of IgE in normal and allergic sera by radioimmunoassay. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1971 ; 77 : 690-699.
35. Irañeta S.G., Duschak V., Rodríguez S.M., Alonso A. : Serine proteinases with gelatinolytic activity in an *Aspergillus fumigatus* allergenic extract. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 2002 ; 12 (4) : 257-262.
- 36.- Pomilio A.B., Battista S.M., Alonso A., Vitale A.A.: Valor de la micología como complemento de los análisis químicos, bioquímicos y palinológicos en las investigaciones forenses y paleoecológicas. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 2018 (4): 33-60.
- 37.- Pomilio A.B., Battista S.M., Alonso A.: Micetismos. Parte 1. Síndromes con período de latencia tardía. *Acta Bioquim. Clin. Latinoamer.*, 2018 (en prensa).

+++++\*\*\*\*\*+++++

## ALERGIA A LOS HYMENÓPTEROS : ETIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Ángel Alonso

### Introducción.

Los insectos comprenden el 80% del total del reino animal con más de 600.000 especies. A pesar de su pequeño tamaño, desempeñan un papel muy importante en la naturaleza, sea actuando como animales depredadores de parásitos, o como alimento de otros seres vivos. Algunos son muy útiles para el hombre, como los gusanos de seda o las abejas, que intervienen en la producción de miel y cera y en la polinización de los árboles frutales.

Otras especies tienen valor de forma indirecta, porque destruyen plagas, como algunos escarabajos, que controlan el crecimiento de los parásitos de los vegetales. Sin embargo, los insectos también destruyen, según estudios, entre el 10 al 15% de las cosechas del mundo.

Son vectores de muchas e importantes enfermedades infecciosas y además, pueden originar cuadros alérgicos por la inhalación de sus cuerpos en putrefacción o momificación, y por sus heces, como se demostró en el síndrome rinitis/asma bronquial, para los ácaros del género *Dermatophagoides* y las cucarachas *Periplaneta americana* y *Blattella germanica*.

Otros pertenecientes al orden de los heterópteros y de los dípteros (pulgas y mosquitos) originan reacciones locales por succión de la sangre del individuo y, además, la saliva contiene antígenos que originan sensibilización. Recordar que el *Triatoma protracta*, que es un reduviedo emparentado con el *Triatoma infestans* (nuestra vinchuca), produjo en trabajadores rurales de Texas (EEUU), reacciones cutáneas por sensibilización a su picadura, con anticuerpos específicos contra dicha saliva, sin connotaciones infecciosas pues esa variedad no transmite el *Trypanosoma cruzi*.

Entre los Hymenópteros de mayor importancia hay especies endémicas, y especies introducidas deliberadamente (la abeja melífera y varios parasitoides), y otras en forma inadvertida (varias hormigas domésticas y algunos parasitoides).

Llamase parasitoide a aquel individuo que vive a expensas de otro, al que termina matando; los entomófagos parásitos son, en realidad, parasitoides. En relación a los Hymenópteros se designan así a ciertos tipos de vida intermedia entre el parásito y el predador, ya que algunas larvas de Hymenópteros se alimentan en el cuerpo vivo de otro organismo causándole su muerte antes de su maduración.

Una de las invasiones biológicas más exitosas que ocurrieron en el neotrópico es la de la abeja melífera africana, que se extendió por toda la región (Schneider *et al.*, 2004).

Es una excelente productora de miel y se adapta muy bien al clima tropical, pero constituye una amenaza para la fauna nativa.

En las islas Galápagos, los insectos que llegaron en forma accidental y que han afectado a la fauna originaria son los Hymenópteros; tal es el caso de la hormiga, *Wasmannia auropunctata* (Lubin, 1984; Paiva en Williams, 1994; Causton *et al.*, 2005) y de los vespídos, *Polistes versicolor* y *Brachygastra lecheguana* (Peck *et al.*, 1998).

En Chile y Argentina, el arribo de *Vespula germanica* (Vespidae) podría tener consecuencias ecológicas muy serias (Moller, 1996), como pasó en Nueva Zelanda (Beggs en Austin y Downton, 2000). Cabe destacar que los parasitoides, como mecanismo de control biológico, han resultado en ahorros millonarios (Jutsum, 1988).

Así como la adición de especies puede tener repercusiones imprevisibles, la sustracción de especies nativas (extinción) puede ser irreparable. Unas especies nativas del geotrópico (“abejas de las orquídeas”), polinizan los árboles de nuez brasileña (*Lecythidaceae: Bertholettia excelsa*), pero cuando el árbol no está en flor (once meses al año), las abejas dependen del resto del bosque para encontrar otras fuentes de polen.

Los machos de las abejas dependen de la presencia de orquídeas epífitas para obtener atraerentes sexuales. La deforestación arrasa las orquídeas y las otras fuentes de polen, y con ellas acaba el polinizador; y acaba también la producción de nueces (Prance, 1987).

La conservación de especies nativas resulta esencial para mantener el rendimiento de frutos y para mantener la biodiversidad (Matheson *et al.*, 1996; Allen-Wardell *et al.*, 1998).

Es más, las especies parasíticas de Hymenóptera podrían ser vitales para el funcionamiento de los ecosistemas naturales (La Salle y Gauld, 1991, 1993).

Las picaduras de los Hymenópteros (abejas y avispas) originan reacciones cutáneas, con los signos inflamatorios clásicos (calor, rubor, tumor y edema), que evolucionan espontáneamente hacia la desaparición total. Sin embargo, en determinadas personas producen síntomas graves y, ocasionalmente, reacciones alérgicas mortales.

La primera descripción de una reacción alérgica grave por picadura de Hymenópteros se remonta a una inscripción encontrada en la tumba del faraón egipcio Menes, fundador de la ciudad de Menfis, hace unos 5.000 años, y que significó su muerte tras ser picado por una gran avispa o avispon en la nariz. Este hecho nos podría estar señalando que en la población egipcia del aquel tiempo, ya se encontraría expresado el gene épsilon en el ADN del LB, que regula la síntesis de la IgE sérica, que, por otra parte, hallaría correlato con el hábito de los trabajadores rurales de no usar calzado, y que serían fácilmente parasitados a través de su piel desnuda por las larvas de parásitos existentes en el suelo, cuyos antígenos son notables estimuladores de la producción de IgE sérica, en una fallida tentativa de “protección anti-parasitaria”, como ocurre en nuestros días, en nuestro país, especialmente en las provincias del NOA y del NEA, y en muchos países de América Latina.

En 1765, Desbrest, médico de campo del rey de Francia, describe el colapso inmediato, rubor y muerte, de un sujeto después de la picadura de una abeja. En los últimos años, se ha descubierto que, incluso una única picadura, que para la mayoría de la gente es un hecho banal, puede originar una grave reacción o incluso llegar a ser mortal.

La mayoría de las reacciones sistémicas graves y, en especial, las reacciones mortales, se producen entre los 30 y 60 minutos después de la picadura.

Las abejas pican cuando se las provoca, tienen un aguijón con espículas laterales a manera de arpón que queda clavado, desprendiéndose del abdomen juntamente con el resto de las vísceras del insecto al levantar éste el vuelo. Los músculos del saco del veneno expulsan hasta 50µl de veneno en la zona de la picadura en 2 ó 3 minutos, provocando la reacción descrita. Tras la picadura se produce una sensación de ardor intenso que dura varios minutos, seguida de la formación gradual, alrededor de la picadura, de una zona blanca y un habón eritematoso cada vez mayor que persiste de 2 a 3 horas. Tras desaparecer el eritema, el prurito, la irritación y la sensación de calor pueden durar 24 horas.

Los vespídos más agresivos son las *Vespa* (yellow jackets), que pican sin provocación. Se puede sufrir una picadura al tocar un nido de avispones o un panal de avispas. Los vespídos no se desprenden de su aguijón, al no contener espículas laterales como las abejas. La reacción local producida por ellos es similar o algo menor a la de las abejas, especialmente la de *Pollister dominulus*, la avispa papelera.

Los insectos tienen: **1)** un esqueleto quitinoso; **2)** un tamaño relativamente pequeño (menor de 30 cm); **3)** una ilimitada adaptabilidad, excepto en los mares; **4)** son capaces de volar y **5)** sufren una metamorfosis completa, con larvas, con patas, pupas con apéndices libres, no pegados al cuerpo y capullos. Los adultos tienen 2 pares de alas, más grandes las anteriores que las posteriores. Tienen unas mandíbulas para morder, pero a veces están adaptadas para lamer (véspidos y hormigas) o chupar (abejas).

La mayoría de los insectos son sociales, un amplio grupo que comprende todas las hormigas y muchas abejas, avispas y otros, han desarrollado una división de trabajo en el momento oportuno. Los cambios de conducta y desarrollo se inician por feromonas, que actúan como mensajeros químicos, que transmiten información de un individuo a otro de la colonia. Un notable medio de comunicación es el lenguaje de la danza de las abejas. Las hormigas poseen aspectos muy solidarios en su conducta que condujeron a un grupo de investigadores a definir el “gen del egoísmo” en un importante trabajo publicado en Nature.

### **ENTOMOLOGIA**

Los responsables de las reacciones alérgicas pertenecen al orden de los Hymenópteros. Son casi exclusivamente del tipo social Aculeatae, y de las superfamilias Apidae (abejas), Vespidae (avispa) y Myrmicidae (hormigas), en los cuales el depósito de huevos está adaptado como un arma asociado a la glándula del veneno. El aparato del veneno es usado para paralizar a los animales que apresan y contra el hombre lo utilizan como defensa exclusivamente. Los Aculeatae o insectos picadores se caracterizan por la típica “cintura de avispa”, localizada en el segundo segmento abdominal y que se visualiza mejor en los véspidos y hormigas que en las abejas.

<b>Taxonomía del orden Hymenóptera</b>			
<b>Familia</b>	<b>Subfamilia</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>
Apidae		Apis mellifera Bombus spp. Megabombus spp. Halictus spp. Dialictus spp.	Abeja de la miel Abejorro  Abeja del dulce
Vespidae	Vespinae  Polistinae	Vespula spp. Dolichovespula arenaria Dolichovespula maculate Polistes spp.	Yellow jacket Avispón amarillo Avispón cara blanca Avispa del papel
Formicidae		Solenopsis invicta Myrmecia spp. Pogonomyrmex spp. Pachycondyla spp.	Hormiga de fuego Hormiga saltadora Hormiga cosechadora

### **MORFOLOGIA**

La cabeza se compone de 6 segmentos fusionados. Tienen 2 ojos compuestos (ommatidia) que detectan movimiento y colores, y 3 ocelli simples que registran la intensidad de la luz. El par de antenas, de entre 10 y 13 segmentos, les sirven como órgano de olfato y gusto. La mandíbula está adaptada para morder, sorber o chupar. El tórax tiene 3 segmentos, con un

par de patas, pero el segundo y el tercero llevan un par de alas. En las abejas, las patas constituyen órganos de recolección y transporte de polen, además de un medio de locomoción. El abdomen se compone de 10 segmentos, con la típica “cintura fina o de avispa” en el segundo segmento. El aparato del veneno consiste en un estilete o punzón fino y largo, y dos lancetas que cubren el canal del veneno, que se puede mover hacia dentro y hacia afuera. El veneno es producido en una glándula ácida, se almacena en el saco y sale del mismo a través del canal, inyectándose en la herida de la picadura. Las lancetas tienen unas barbas que se van introduciendo en la piel humana que impide su retracción; pero no ocurre igual en los cuerpos quitinosos de sus enemigos o víctimas naturales, de los cuales sí pueden ser retirados sin problemas. Los insectos sociales sólo pican en defensa o cuando los humanos nos acercamos a una distancia crítica de sus nidos.

El aparato del veneno de las abejas queda en la piel e impulsa veneno hacia el paciente por contracciones peristálticas durante un largo periodo. Si el aguijón no es apartado con cuidado, se introduce más veneno al comprimir el saco. Los vespídeos normalmente no pierden su aguijón y pueden picar varias veces agarrados con sus mandíbulas a la piel, sin producirse daños en su aparato de veneno.

Dependiendo de si lo ha usado previamente con otros insectos o incluso personas, la cantidad de veneno en su saco puede variar. En el caso de las abejas, se encuentran valores constantes, alrededor de  $50 \pm 7 \mu\text{g}$  de proteína de veneno por picadura. Con los vespídeos se observa significativamente menos cantidad de veneno, un promedio de alrededor de 1,7 a  $5 \mu\text{g}$ . Sin embargo, los vespídeos pueden picar hasta 7 veces seguidas. La cantidad de veneno inyectado varía entre 0,5-2,5 ml, y hay también picaduras sin veneno inyectado. Después de las 2 primeras picaduras, la cantidad de veneno decrece.

## TAXONOMIA

**Apidae:** La abeja europea (*Apis mellifera*), también conocida como abeja doméstica o abeja melífera, es una especie de Hymenóptero apócrito (las formas más avanzadas de los Hymenópteros) de la familia Apidae. Es la especie con mayor distribución en el mundo.

Originaria de Europa, África y parte de Asia, fue introducida en América y Oceanía. Fue clasificada por Carolus Linnaeus en 1758. Desde entonces los taxónomos describieron variedades geográficas o subespecies que, en la actualidad, superan las 30 razas. Muchas son abejas sociales, especialmente las de la subfamilia Apidae, pero otras son abejas solitarias y algunas son parásitas, es decir que ponen sus huevos en los nidos de otras abejas.

El comportamiento social parece haber evolucionado en más de un grupo. En sus sociedades hay distintas castas, con una reina que se dedica a la reproducción y obreras no reproductivas, que hacen todas las tareas de mantenimiento del nido. Además están los machos o zánganos. *Apis mellifera* es un ejemplo de eusocialidad, es decir del grado más avanzado de socialidad con colonias permanentes. Otras, como los abejorros, presentan un grado de socialidad menos complejo con una reina iniciando anualmente una colonia nueva. Todas las especies no parásitas y en especial las eusociales son excelentes polinizadores porque visitan flores cuando colectan néctar y polen. Los Apidae se dividen en el género *Apis mellifera* o abeja de la miel, y el género *Bombus* sp. La especie más significativa que causa reacciones alérgicas es la domesticada *Apis mellifera* (honey bee o abeja de la miel), varias razas de las cuales son cultivadas por el hombre por todo el mundo para la producción de miel y la polinización de árboles frutales. Las diferentes razas son muy similares morfológicamente y en sus venenos. Difieren en su capacidad de invernar y en su agresividad, como es el caso de la brasileña.

Al contrario que el género *Bombus* ( de tamaño mucho mayor y que se está utilizando en la polinización de plantas en los invernaderos) y los vespídos, la abeja de la miel o común sobrevive en su nido durante todo el invierno. El cuerpo de las abejas es peludo o plumoso, de color pardo, con bandas claras apenas perceptibles. Las picaduras ocurren en verano, invierno o días soleados, y son más frecuentes en primavera e inicio del verano.

En Europa, el género *Apis* y su especie *Apis mellifera* es la única responsable de las reacciones alérgicas, aunque el género *Bombus* está produciendo picaduras en los invernaderos.

### **VENENOS DE LOS HIMENOPTEROS**

Es una mezcla compleja de péptidos pequeños, aminas vasoactivas y proteínas. La **apitoxina**, descubierta por el Ing. Agrónomo Eduardo Martínez Rubio, en 1936, en Uruguay, es el veneno secretado por las obreras, que lo usan como medio de defensa contra predadores y para el combate entre ellas. En las especies venenosas, el ovipositor de las obreras se ha modificado para transformarse en un aguijón barbado. No es una sustancia simple, sino una mezcla compleja; aunque los efectos suelen atribuirse a su acidez, el ácido fórmico apenas está presente, y procede de una de las 2 glándulas implicadas en la secreción. La más activa de ellas es un líquido alcalino formado por el polipéptido citotóxico melitina ( $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ ). Se la ha empleado como terapéutica antiinflamatoria en las enfermedades articulares debido a su contenido de un péptido llamado 401 o apamina, que posee propiedades neuro-analésicas (apiterapia o apitoxoterapia). Contiene la **fosfolipasa A<sub>2</sub>**, que es su principal alérgeno, **hialuronidasa** y una **fosfatasa ácida** que también son alergénicas. Cerca de un tercio de los sensibles al veneno tienen anticuerpos IgE específicos para la **melitina**. La **apitoxina** es segregada por las hembras de varias especies de abeja, que utilizan el ovipositor para inocularla. La secreción proviene de glándulas ubicadas en la base del aguijón que están compuestas de células dotadas de canaliculos. La configuración exacta varía; en las Apinae, Andrenidae y Bombinae los tubos se unen cerca de su origen, mientras que en Vespiniae, Polistinae y Eumeninae desembocan por separado. A su vez, en Sphecinae, Phylantinae y Cabroninae presentan ramificaciones. Además de los tejidos secretores de la sección tubular, las abejas poseen un segundo grupo secretor, o de glándulas sinuosas. Las glándulas secretan un líquido fuertemente alcalino, compuesto en un 52% por **melitina**; además de ésta, contiene **apamina** (una neurotoxina), **adolapina** (un analésico), **fosfolipasa** (una enzima que destruye la membrana celular atacando los fosfolípidos que la componen, inactiva la tromboquinasa e inhibe la fosforilación oxidativa), **hialuronidasa** (un vasodilatador y hemolítico, que ayuda en la dispersión del veneno), **histamina**, **dopamina** y **noradrenalina**.

El efecto fundamental del veneno es citotóxico, destruyendo las membranas celulares e induciendo a los receptores de dolor a percibir un daño mayor del que realmente se ha infligido. Las glándulas sinuosas, a su vez, producen una toxina ácida.

En estado puro, la **apitoxina** es un líquido incoloro, amargo y ácido (pH 4,5 a 5,5), con un peso específico de 1,1313. Es hidrófilo y ácido soluble, pero insoluble en alcohol. Las pequeñas concentraciones de histamina se ven amplificadas por la secreción de ella en el individuo atacado. Esto puede desencadenar un choque anafiláctico, sea instantáneamente o hasta 24 horas después de la picadura. Alrededor de un 2% de la población es sensible a la **apitoxina**, pero sólo un 0,05% se estima que sufre sensibilidad extrema.

Las sustancias del veneno de los vespídos son similares, aunque difieren en cantidades relativas. Entre ellas se encuentran la hialuronidasa, la **fosfolipasa A<sub>1</sub>** y el **antígeno 5**.

Existe reactividad cruzada entre los venenos de *Vespula*, *Vespa* y *Dolichovespula*.

La escasa reactividad cruzada entre los vespídeos y las abejas se debe al componente glúcido de las glicoproteínas de los venenos, aunque la hialuronidasa también es responsable de la reactividad cruzada entre ambas especies. El **antígeno 5** se ha clonado y secuenciado, identificándose 2 formas que son antigénicamente similares, pero que difieren en más del 15% de su secuencia entre los Polistes americanos, de donde se extraen los venenos para las vacunas actuales, y los Polistes europeos (*P. dominulus* y *gallicus*), que apenas difieren en su composición (98% de identidad en su secuencia proteica). Este antígeno comparte homología con las proteínas de los tomates y de la hoja del tabaco.

Alérgenos del veneno de Hymenópteros				
Especies	Alérgeno	Peso mol. (kDa)	Función	Alergenicidad
Abeja ( <i>Apis mellifera</i> )	Api m1	16	Fosfolipasa A <sub>2</sub>	++++
	Api m2	44	Hialuronidasa	+++
	Api m4	3	Melitina	+
	Api m6	7-8		
Bombus ( <i>B. pensylvanicus</i> )	Bom p1	16	Fosfolipasa	
	Bom p4		Proteasa	
Vespídeos ( <i>Dolichovespula</i> sp, <i>Vespa</i> sp, <i>Vespula</i> sp, <i>Polistes</i> sp)	Grupo 1	34-35	Fosfolipasa A <sub>1</sub>	+++
	Grupo 2	44	Hialuronidasa	+++
	Pol d4	32-34	Serin- proteasa	++
	Grupo 5	23	Antígeno 5	+++
Hormigas ( <i>Solenopsis invicta</i> )	Sol 1 2	24		
	Sol 1 4	13		
Modificado de Weber RW. Lin Rev Allergy & Immunol 2001.				

**Fosfolipasa A<sub>2</sub>**: pertenece a la superfamilia de enzimas que hidrolizan los ácidos grasos de la membrana fosfolipídica y producen mediadores lipídicos. Más de 20 diferentes tipos de **fosfolipasa A<sub>2</sub>** están presentes en las células de los mamíferos, en las serpientes y en las abejas.

*(Estamos estudiando la reactividad cruzada entre los venenos de las serpientes de nuestro NEA (noreste argentino) y de las abejas).*

La **fosfolipasa A<sub>2</sub>** libera ácido araquidónico, un precursor de eicosanoides incluidas las prostaglandinas, los leucotrienos y los lisofosfolípidos. La familia de la **fosfolipasa A<sub>2</sub>**, de la cual 10 isoenzimas han sido identificadas, presentan un peso molecular bajo y requieren Ca<sup>2+</sup>. La familia de la **fosfolipasa A<sub>2</sub>** citosólica consiste en 3 enzimas, la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica *alfa* juega un papel esencial en la iniciación del metabolismo del ácido araquidónico.

**Hialuronidasa**: degrada oligonucleótidos derivados de la cadena NH<sub>2</sub> terminal. La secuencia aminoacídica de la **hialuronidasa** del veneno de abeja, es un polipéptido compuesto por 349 aminoácidos conteniendo 4 cisteínas y 3 sitios potenciales para la N-glicosilación. Diferentes tipos de **hialuronidasa** hidrolizan cadenas largas de N-acetilglucosamina y D-ácido glucurónico, presentes en el ácido hialurónico. La **hialuronidasa** también está presente en el veneno de las serpientes, escorpiones, abejas y avispa. Esta enzima, en las abejas, originalmente fue descrita como “factor de propagación” que facilita la difusión de otros constituyentes del veneno, ha sido purificada y mostrada como una glicoproteína de peso molecular de alrededor de 43 kDa.

**Melitina:** Es el principal componente tóxico de la abeja Europea *Apis mellifera*, siendo un péptido catiónico y hemolítico. Es un pequeño péptido lineal de tan sólo 26 aminoácidos en la cual el aminoácido NH<sub>2</sub> terminal es predominantemente hidrofóbico, mientras que la región carboxilo terminal es hidrofílica. Se demostró que inhibe el crecimiento y produce apoptosis en varios tipos celulares.

**Fosfatasa ácida :** según los trabajos de Grunwald y colab., de 2006, otorgan un valor superlativo a esta sustancia como el principal alérgeno del veneno de la abeja. Denominada también **Api m 3**, se constituye así en la proteína más útil para el diagnóstico y tratamiento de la hipersensibilidad a dicho veneno.

El clonado de la **Api m 3**, su amplificación por PCR a un fragmento de 1122-bp DNA, su actividad enzimática a pH 4,5 y el estudio por espectrometría de masa, confirmaron sus propiedades como antígeno capaz de inducir el 37 % de la IgE específica en el suero de los humanos, que sufrieron alguna reacción de hipersensibilidad por la picadura de la abeja.

No obstante, estos hallazgos no desmerecen la importancia de todas las otras sustancias descritas más arriba y que componen la totalidad del veneno de la abeja, y que participan activamente en la génesis del fenómeno inflamatorio subsecuente a la picadura del Hymenóptero.

### **EPIDEMIOLOGIA**

Se sabe que una única picadura de abeja puede desencadenar una reacción alérgica muy grave en un sujeto previamente sensibilizado, incluso en ocasiones, con consecuencias fatales. Su prevalencia oscila entre el 3,5% y el 22% de la población general; las reacciones locales extensas son 2 a 3 veces más frecuentes que las reacciones sistémicas. Se produce con mayor frecuencia en áreas cálidas y secas, que en las zonas húmedas y frías y en la población adulta más que en la joven, debido a que los adultos han tenido más tiempo para sensibilizarse. El grado de exposición viene determinado por la profesión que desarrolla cada individuo, así como factores sociales, culturales y climáticos. Se describe una proporción de los hombres con respecto a las mujeres, alrededor de 2:1, esto generalmente por el mayor grado de exposición de los hombres, quienes más frecuentemente trabajan al aire libre. Los estudios prospectivos demuestran que los pacientes con historia de una reacción alérgica a picadura de abeja o Hymenópteros reaccionarán si vuelven a ser picados, lo que depende de una serie de factores de riesgo. Los niños tienen mejor pronóstico que los adultos.

La picadura inicial probablemente inicie la respuesta a IgE, y de este modo, prepara al individuo para una reacción sistémica que aparecerá con la siguiente picadura. Se sabe que la mayoría de los apicultores tienen IgG frente al veneno de abeja, y que la IgE específica variaba según las poblaciones. De acuerdo con esto, 50 picaduras por año parecen conferir un mínimo de protección; cuando los apicultores fueron picados más de 200 veces por año, el riesgo de alergia estuvo ausente. Los pacientes que reciben fármacos  $\beta$ -bloqueantes o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina presentan mayor riesgo de sufrir una reacción alérgica, ya que estos fármacos pueden interferir con el metabolismo de la bradiquinina, aumentando sus niveles.

En Norteamérica y Francia, las picaduras de insectos producen más muertes que las mordeduras de serpientes. La mayoría de los que mueren son adultos, aunque el grupo más expuesto es el de los menores de 20 años. El pico de incidencia ocurre en pacientes entre 35 y 55 años. Las muertes por picaduras pueden sobrevenir, tanto por reacciones **alérgicas** (95%) como por reacciones **tóxicas** (5%). En las reacciones **alérgicas** a los venenos, el choque anafiláctico parece estar implicado en la causa de muerte. Las causas de muerte descritas



en Dinamarca son, en el 65 al 80% de los casos por choque anafiláctico, 15% por asfixia tras una picadura en la vía respiratoria (boca, lengua, nariz), y el 20% por enfermedad preexistente, especialmente arteriosclerótica.

En el caso del choque anafiláctico la muerte sobreviene rápidamente tras la picadura (15-45 minutos), mientras que el intervalo entre la picadura y la muerte es mayor (30 minutos a 2 horas) cuando la muerte es por asfixia. Para que el veneno produzca la muerte por **toxicidad** directa son necesarias 500 picaduras, aunque en los niños pueden ser suficientes de 30 a 50. El envenenamiento masivo por abejas produce reacciones tóxicas inmediatas y retardadas. Las inmediatas consisten en náuseas, vómitos, hemólisis, fallo renal y coagulación intravascular diseminada. Las retardadas son reacciones inicialmente asintomáticas excepto por dolor de la picadura que presenta fallo multiorgánico a las 18 horas del envenenamiento. La muerte sobreviene por fallo renal o cardíaco por los efectos citotóxicos del veneno.

### **CLINICA**

Es muy variada, desde pequeñas reacciones locales hasta reacciones generalizadas o sistémicas. Con menos frecuencia hay reacciones atípicas, de inicio tardío, sin mecanismo patogénico definido, que podrían deberse a un mecanismo inmunológico **no** mediado por IgE, tóxico o ambos. La propia toxicidad del veneno origina parestesias, prurito, vómitos y taquicardia, sobre todo en las picaduras múltiples.

#### **Reacciones locales**

Consisten en dolor, prurito, enrojecimiento y ligero edema en la zona de la picadura, que ceden en pocas horas. La extensa se define como aquella mayor de 10 centímetros de diámetro y de duración mayor de 24 horas, aunque también se acepta a aquella que alcanza su máximo entre las 24 a 48 horas, con un diámetro superior a 8 centímetros y que persiste entre 2 y 7 días. Todos los signos y síntomas aparecen contiguos al sitio de la picadura y con frecuencia abarca 2 articulaciones próximas. Cuando la picadura se produce en el cabeza, especialmente en la zona ocular o periorbitaria, puede aparecer una inflamación desfigurante, con ojos cerrados por el importante edema palpebral. En ocasiones, las reacciones locales extensas de las extremidades se acompañan de tumefacción de los ganglios linfáticos, signos de linfangitis y fiebre. No es frecuente la infección en el sitio de la picadura, debido a las propiedades bacteriostáticas del veneno de la abeja.

Se acepta que las reacciones locales extensas corresponden a una reacción tardía mediada por IgE, aunque algunos autores opinan que está implicado, además un mecanismo del tipo IV, ya que en algunos casos se demostró positividad en el TTL y en las pruebas cutáneas tardías.

**Reacciones sistémicas :** suelen aparecen en un periodo corto tras la picadura, desde unos minutos hasta 1 hora. La reacción sistémica clásica es la anafilaxia con mayor o menor gravedad.

Müller clasifica las reacciones sistémicas en 4 grados:

<b>Clasificación clínica de las reacciones sistémicas por Hymenópteros</b>	
Grado I	Urticaria generalizada, prurito, malestar, ansiedad
Grado II	Angioedema o cualquiera de las anteriores más dos de las siguientes: tirantez torácica, náuseas, vómitos, diarrea, mareo, dolor abdominal
Grado III	Disnea, broncoespasmo, estridor o

	cualquiera de las anteriores más dos de las siguientes: disfagia, confusión, sensación de muerte inminente
Grado IV	Cualquiera de las anteriores más dos de las siguientes: hipotensión, colapso, pérdida de conciencia, incontinencia de esfínteres, cianosis

Aunque actualmente es más práctico clasificar las reacciones sistémicas en anafilaxia leve, moderada o grave, definidas de la siguiente manera:

- 1.- **Leve:** prurito generalizado, eritema, urticaria aguda ;
- 2.- **Moderada:** síntomas respiratorios leves (tos, sibilancias), síntomas digestivos (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal), malestar general y angioedema con o sin síntomas cutáneos y
- 3.- **Grave:** incontinencia de esfínteres, síntomas cardiorrespiratorios graves (edema de glotis, broncoespasmo, hipotensión arterial, cianosis, choque anafiláctico), con o sin síntomas incluidos en el apartado anterior.

**Síntomas cutáneos:** son los más frecuentes y están presentes en el 80% de los casos, siendo la única manifestación en el 60% de los niños y en el 15% de los adultos. Es habitual la *urticaria generalizada*, acompañada de prurito intenso y en ocasiones de angioedema. Este puede aparecer solo, sin urticaria, en zonas alejadas del lugar de la picadura; por lo general tarda más tiempo en resolverse afectando con más frecuencia la cabeza, menos las extremidades siendo rara vez generalizado, pudiendo comprometer la vida cuando afecta la laringe.

**Síntomas respiratorios:** un gran número de personas sufren dificultad respiratoria, por obstrucción bronquial, que se manifiesta con sibilancias. Esta dificultad también puede ser debida a edema laríngeo, con aparición de estridor y disfonía. Se han descrito casos de edema pulmonar alérgico, neumotórax y hemorragia pulmonar aguda. Las alteraciones en la vía respiratoria y el edema laríngeo son la principal causa de muerte por picadura de Hymenópteros.

**Síntomas cardiovasculares:** pueden aparecer desde un ligero mareo o palpitaciones hasta el temido choque anafiláctico con hipotensión, pérdida del conocimiento y relajación de esfínteres. La hipotensión es el resultado de la pérdida de fluidos por aumento en la permeabilidad vascular o por pérdidas hacia el exterior como vómitos o diarreas importantes, disminución del gasto cardiaco por hipoxia y acidosis producidas por obstrucción de la vía respiratoria y por efecto directo de los mediadores liberados en la anafilaxia. Los síntomas cardiovasculares se consideran responsables sólo de una pequeña parte de las muertes producidas por picaduras de Hymenópteros.

**Síntomas gastrointestinales:** un tercio de los pacientes presentan síntomas gastrointestinales, habitualmente en combinación con síntomas cutáneos, respiratorios y cardiovasculares. Los más frecuentes son las náuseas y el dolor abdominal, pudiendo aparecer también vómitos y diarrea. Son causados por una reacción del tipo I en la pared del intestino con edema de la mucosa y espasmo del músculo liso.

**Reacciones atípicas:** además de las reacciones de tipo inmediato que representan el 90% de todas las reacciones sistémicas, en ocasiones se observan reacciones que aparecen horas o incluso días después de la picadura. Se han descrito cuadros con aparición de fiebre, artralgias con inflamación articular, linfadenopatías y urticaria-angioedema. Aunque la

enfermedad del suero es una reacción del tipo III (inmunocomplejos) en la mayoría de estos casos no se han podido demostrar, por eso, se sugiere que se trataría de la *fase tardía* de la IgE. También se ha descrito vasculitis necrotizante, púrpura de Schönlein-Henoch, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica y alteraciones de la coagulación como la CID (coagulación intravascular diseminada) en el seno de una reacción anafiláctica grave. A nivel del sistema nervioso central se han descrito neuritis de nervios centrales o periféricos desencadenada probablemente por un mecanismo tóxico directo o como consecuencia de la presión ejercida por el edema. Hay casos de Guillain-Barré, convulsiones, hemiparesias o accidentes cerebrovasculares isquémicos de tipo transitorio. También se han descrito lesiones de glomerulonefritis, sospechándose la implicancia de la IgE en la patogénesis de la enfermedad, y casos de síndrome nefrótico en niños con un cuadro superponible al de la glomerulonefritis de cambios mínimos.

**Reacciones por múltiples picaduras:** si una persona sufre muchas picaduras presenta manifestaciones clínicas por los efectos tóxicos del veneno recibido, que son similares a las de una reacción anafiláctica. Los efectos tóxicos aparecen a partir de 50 picaduras siendo la dosis letal para un niño de 100 picaduras y de 500 para un adulto. La **fosfolipasa** altera los fosfolípidos de la membrana del eritrocito, produciendo hemólisis que con la rhabdomiolisis lleva a insuficiencia renal. Se produce deficiencia de factores de la coagulación por fallo hepático y la muerte suele ocurrir por insuficiencia renal, alteraciones de la coagulación o lesiones cerebrales en los días siguientes a las picaduras. Además se producen reacciones alérgicas graves en los pacientes sensibilizados.

### **DIAGNOSTICO**

El diagnóstico se basa en 2 parámetros: una historia clínica sugerente de una reacción alérgica tras una picadura y la demostración de la IgE específica frente al veneno del Hymenóptero sospechoso. Se deben determinar los síntomas y la cronología de la reacción. Es importante conocer el tiempo de latencia entre la picadura y el inicio del cuadro. Tener en cuenta patologías crónicas de los pacientes que puedan incrementar la gravedad del cuadro (ingestión de beta-bloqueantes). Se acepta que las reacciones locales extensas no requieren más estudios diagnósticos, que son susceptibles al tratamiento sintomático, y no se consideran una indicación para la inmunoterapia.

Las **pruebas cutáneas** son el método más rápido, sensible y accesible para detectar la IgE específica contra el veneno de abeja y contra todos los venenos de Hymenópteros. Se dispone de venenos purificados de abeja, de *Vespula* y de *Polistes*. Una prueba cutánea positiva y con historia clínica positiva es suficiente para el diagnóstico, pero puede haber datos discordantes, como pruebas negativas con historia de alergia al veneno, o bien, pruebas positivas para más de un veneno.

**Fabricación de extractos de venenos:** en el siglo XX se produjeron importantes avances en el tratamiento de la alergia a Hymenópteros. Al principio (1920) se utilizaron extractos de cuerpo completo de abeja como diagnóstico y tratamiento, y más tarde (Hunt, 1978), describió que la utilización de extractos de veneno de Hymenópteros era mucho más eficaz y, por último, con técnicas de biología molecular se ensayaron proteínas recombinantes, con gran seguridad y eficacia. Recientemente, el mejor conocimiento de los mecanismos de acción de la inmunoterapia permitió realizar un estudio con los principales epitopos-T (sitios de reconocimiento en la molécula alérgica por los linfocitos T), de la fosfolipasa A2 y de la fosfatasa-ácida, alérgenos mayores del veneno de abeja, cuyos resultados preliminares son similares al tratamiento con veneno completo.

**Estandarización de extractos alérgicos de Hymenópteros:** se puede definir como el

mantenimiento constante de la actividad biológica, además de minimizar las variaciones en su composición lote a lote con el fin de conseguir diagnósticos y tratamientos de mayor calidad, más seguros y eficaces. Estos 3 importantes objetivos de la estandarización se pueden definir como que la calidad depende, principalmente, de la composición de los extractos en términos de presencia o ausencia de los componentes individuales y de su concentración en el extracto. La caracterización bioquímica y la determinación de la potencia hacen a los tratamientos y diagnósticos más seguros.

**Selección de la materia prima:** en el caso del veneno de abeja se obtiene por estimulación eléctrica de los insectos vivos de *Apis mellifera*. El equipo colector, puesto en la entrada de una colmena, consiste en una malla de cobre o acero, electrificada que debajo tiene una membrana. Cuando la abeja entra o sale y se pone en contacto con la malla eléctrica recibe una electroestimulación que la hace picar la membrana, descargando el contenido del saco de veneno en un recipiente de cristal, evitando la penetración de otras partículas. Una media de 10 a 20 colmenas o alrededor de 10.000 a 20.000 insectos deben ser sometidos a este proceso para obtener 1 g de veneno de abeja.

**Pruebas:** se realizan mediante intradermorreacciones seriadas, empezando por concentraciones de 0,001µg/ml hasta 0,1µg/ml para el veneno de abeja. Cuando el paciente refiere un cuadro de gravedad extrema, es recomendable empezar por la prueba intraepidérmica (prick-test), o bien comenzar con las intradermorreacciones con una concentración más baja, de 0,0001 µg/ml.

Ante una historia de alergia y pruebas cutáneas negativas, siempre hay que repetir las mismas pasadas unas semanas, y si persistieran negativas, intentar demostrar la existencia de la IgE por otras técnicas.

El riesgo principal es el de inducir una reacción generalizada. En aquellos con síntomas graves o desencadenados por cantidades presumiblemente mínimas (picadura a través de la ropa) las pruebas deben comenzarse por concentraciones muy bajas (0,0001 µg/ml) o bien utilizar técnicas in vitro. Se sugiere comenzar con una dilución 1/1.000.000 del extracto concentrado.

Siempre solicitar el **consentimiento informado** y poseer el **equipo instrumental** adecuado para tratar esta urgencia alergológica.

#### **Determinación de la IgE in Vitro :**

**1.- RAST/CAP :** un tercio de los pacientes con historia compatible de alergia presentan pruebas cutáneas negativas. No obstante, la determinación de la IgE específica por RAST (radioalergosorbent test) (Ceska,1972), es aún menos sensible que las pruebas cutáneas; aproximadamente del 15 al 20% de los pacientes con pruebas cutáneas positivas presentan RAST negativo. Sin embargo, un 5 o un 10% de los pacientes con pruebas cutáneas negativas e historia positiva son RAST positivos, o sea que, la determinación de la IgE específica por RAST es útil para el diagnóstico.

**2.-Técnicas de inhibición :** la más frecuente es la inhibición de RAST/CAP, aunque también se utiliza la inhibición de la inmunodetección.

**3.- IgG específica :** no es útil para el diagnóstico de la alergia al veneno de abeja, no sirve para predecir el riesgo de reacción frente a nuevas picaduras.

**4.- Inmunodetección (Western blot) :** determina la existencia de la IgE específica para las diferentes proteínas contenidas en un extracto previamente separadas por electroforesis. Es un método de utilidad en investigación; no se emplea en la rutina diagnóstica.

**5.- Pruebas de Provocación in Vitro :** la respuesta inmediata se caracteriza por la activación de mastocitos inducida por el alérgeno con la consiguiente liberación de

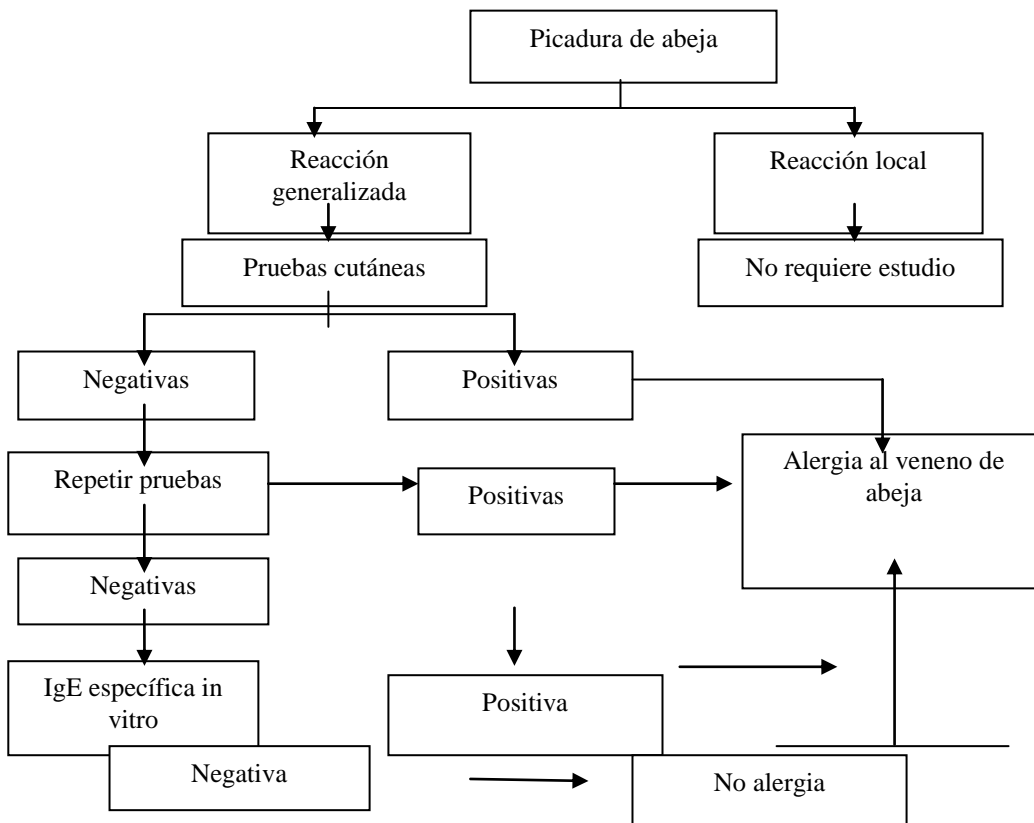
sustancias biológicamente activas almacenadas en los gránulos (histamina) o producidas rápidamente (leucotrienos). Los mastocitos no son susceptibles de estudios in vitro, pero si los basófilos de sangre periférica (desgranulación según técnicas de Benveniste y Feliú).

**6.- Liberación de la histamina :** es una prueba que tiene elevada sensibilidad y especificidad , pero sin correlación con la gravedad del cuadro.

**7.- Liberación de leucotrienos por basófilos:** se correlaciona bien con los resultados de la liberación de histamina, pero difiere con las determinaciones de la Ig E específica. No se aplica en el diagnóstico de rutina, aunque puede ser útil en el laboratorio de investigación al igual que los dosajes de triptasa.

**8.- Citometría de flujo :** cuantifica cambios en la expresión de marcadores de superficie celular. Cuando los basófilos reconocen un alérgeno específico modifican la expresión de CD 45, CD 63, CD 69, CD 203c. El marcador más utilizado es el **CD63**, y en menor medida el CD 203c. Cuando se estudian venenos, la sensibilidad y especificidad entre la citometría y la historia clínica es excelente. El marcador **CD 203c** de los basófilos y los mastocitos dan resultados similares .

Algoritmo diagnóstico ante las picaduras de las abejas



## PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

<b>Medidas preventivas aconsejables a pacientes alérgicos al veneno de abeja</b>
1. Evite acercarse a árboles frutales, flores, colmenas o proximidades de basura.
2. Evite movimientos bruscos cuando haya abejas cerca
3. Evite manipular colmenas, una persona diferente al paciente debe de removerlas.
4. Cuando la actividad laboral del paciente implique tareas de riesgo (jardinería, recolecta de basura, actividades al aire libre) se debe de indicar la conveniencia de cambiar de actividad y si no es posible, extremar la precaución y contar con la medicación adecuada
5. Cubrir toda la superficie corporal con ropas de colores discretos, no usar perfumes con olores intensos y no llevar ropa holgada que permita el acceso del insecto.
6. Antes de subir al vehículo, comprobar que no hay ninguna abeja en su interior y conducir con las ventanillas cerradas.
7. Cuando se haya estado al aire libre, sacudir la ropa antes de volver a usarla.
8. Tapar correctamente los recipientes de basura y no dejar alimentos al aire libre.
9. Utilizar repelentes para insectos, aunque éstos no confieren una absoluta protección.
10. Los pacientes con reacciones graves deben de contar con medicación de emergencia y adiestrados en su empleo, además deben revisar de forma periódica su caducidad.

**Tratamiento:** cuando la abeja pica, su aguijón continúa inyectando veneno, es aconsejable la extracción del aguijón desprendiéndolo sin apretar, para evitar que penetre parte del veneno que persiste en la bolsa.

El tratamiento de la picadura estará en función de las características de la reacción:

**Reacciones locales:** pueden ser extensas que afecten a más de 10 centímetros, con importante molestia para el paciente. La aplicación de frío retrasa la absorción del veneno. El uso de antihistamínicos orales y corticoides tópicos u orales si la tumefacción es grande, alivia la clínica.

**Reacción sistémica cutánea:** presentan cuadros de urticaria o angioedema con prurito generalizado, pero sin afectar otros órganos. Es suficiente el uso de antihistamínicos orales o parenterales y corticoides.

**Anafilaxia:** cursa con clínica multiorgánica, respiratoria (opresión torácica, disnea sibilante, tos, afectación de laringe), digestiva (dolor abdominal, náuseas y vómitos), cardiovascular (hipotensión o choque anafiláctico). Las manifestaciones cutáneas pueden retrasarse en las reacciones muy graves o estar ausentes.

En la anafilaxia, la **adrenalina** es el fármaco de elección por su rápido efecto. Posee acciones  $\alpha$  (vasoconstricción) y  $\beta$ , con efecto  $\beta_1$  (inotrópico y cronotrópico positivo) y  $\beta_2$  (broncodilatador e inhibidor de la liberación de mediadores).

Se presenta en solución 1/1000 y se administra por vía intramuscular, que es superior a la subcutánea en la cara anterolateral del muslo. La dosis inicial es de 0,3 a 0,5 mg en el adulto y de 0,01 mg/kg en niños, y se repite cada 5 a 20 minutos en caso de no controlar el cuadro clínico.

Luego se encuentran los **antihistamínicos** y los **corticoides**. Se utilizan antihistamínicos de primera generación y la asociación de anti-H1 con los anti-H2, que pueden ayudar a controlar los efectos cardiovasculares de la histamina. Los corticoides previenen las reacciones bifásicas o prolongadas, siendo los más útiles la prednisona, la metilprednisona y la hidrocortisona

**Inmunoterapia** : el mecanismo de acción de la inmunoterapia con veneno es similar al mecanismo inducido por aeroalérgenos. Durante las primeras semanas se observa un incremento en los niveles de la IgE, mientras que en el transcurso del tratamiento prolongado, estos niveles disminuyen

La **IgG específica** aumenta rápidamente, a expensas de la IgG<sub>1</sub>, y luego de la IgG<sub>4</sub>. En otros modelos experimentales demostramos la importancia de los llamados anticuerpos IgG asimétricos en la protección inducida por la inmunoterapia, así como, el mismo tipo de anticuerpo posibilita la persistencia del feto en el útero materno induciendo un tipo de “tolerancia” serológica durante el embarazo.

Se implica a la IL-10, que al parecer actúa como supresora de la IgE total y específica y reguladora de la IgG. La inmunoterapia induce un cambio de respuesta de las citoquinas Th2 a las producidas por los LTCD4-Th1, con un descenso en los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13, y la expresión del IL-4R, con un incremento en la producción de IL-10.

<b>Indicaciones de la inmunoterapia</b>		
<b>Tipo de reacción</b>	<b>Pruebas diagnósticas</b>	<b>Indicación para IT</b>
Sistémica grave (grados III/IV de Müller)	Positiva Negativa	Si No
Sistémica leve/moderada (grados I/II de Müller)	Positiva (adultos) Positiva (niños) Negativa	Si/No * No No
Local grande	Positiva/negativa	No

\*La **inmunoterapia (IT)** puede estar especialmente indicada en personas muy expuestas, con reacciones repetidas o en aquellas en las cuales su calidad de vida puede empeorar por el miedo a sufrir una picadura.

Existen casos especiales, tales como:

- a): **Apicultores**; b): **Embarazo**: ningún tipo de inmunoterapia debe iniciarse durante este periodo, pero una vez iniciada y siendo bien tolerada, puede mantenerse ; c): **Infancia**: se debe de comenzar la inmunoterapia en casos de alto grado de exposición, como los hijos de apicultores y d): **Ancianos**: la inmunoterapia puede estar indicada en sujetos muy expuestos, con historia de reacciones sistémicas severas y pruebas diagnósticas positivas. La edad no es una contraindicación.

**Esquemas de tratamiento :**

1.- **Ultrarrápidas** (ultra-rush): se alcanza la dosis de mantenimiento de 100 µg en un solo día. Son pacientes de riesgo, siempre hospitalizado y bajo la supervisión de un especialista. Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, a las 2 semanas se administran dosis de 50 µg con un intervalo de 30 minutos, y se continúa una vez al mes con la dosis completa de mantenimiento.

2.- **Rápidas** (rush): consiste en la inyección diaria de varias dosis, administrando el tratamiento en días consecutivos. **A): Agrupadas (cluster):** Se inyectan varias dosis en un mismo día, con un intervalo semanal entre cada grupo de dosis. **B): Convencional:** Consiste

en la administración única diaria, con un intervalo semanal entre cada dosis, de esta forma puede tardarse entre 14 y 20 semanas en llegar a las dosis de mantenimiento (100 mcg).

La prueba más confiable para valorar la eficacia de la inmunoterapia es la prueba de provocación. Una picadura espontánea bien tolerada informa sobre la eficacia del tratamiento. Las pruebas cutáneas se negativizan en el transcurso del tratamiento.

### Reacciones sistémicas con inmunoterapia

Nº RS (%)	Iniciación			Mantenimiento		
	Abeja	Avispa	Total	Abeja	Avispa	Total
	50	21	71	33	4	37
	(17)	(3)	(7,5)	(7,8)	(0,3)	(2,1)

*Youlten LJF, Atkinson BA, Lee TH. The incidence and nature of adverse reactions to injection immunotherapy in bee and wasp venom allergy. Clin Exp Allergy 1995; 25: 159-65.*

A pesar de sus efectos adversos la inmunoterapia con veneno de abeja es un tratamiento seguro y altamente efectivo en los que han tenido reacciones sistémicas.

La EAACI describe los criterios para interrumpir la inmunoterapia:

- a): tratamiento entre 3 a 5 años;
- b) : no padecer reacciones sistémicas en el curso de la inmunoterapia;
- c): eficacia demostrada del tratamiento mediante pruebas de provocación, o tras haber sido picado en forma espontánea, y
- d): negativización de las pruebas cutáneas y descenso significativo de la IgE específica.

### Nuestra experiencia. División Alergia – Hospital de Clínicas – UBA – Período 1991 a 2011.

Pacientes atendidos con cuadros alérgicos severos : **36** discriminados así :

- 1.- por picadura de abeja : **21** ;
- 2.- por picadura de avispa : **4** ;
- 3.- por picadura de hormiga colorada (*Solenopsis invicta*) : **8** ;
- 4.- por picadura de hormiga negra : **2** , y,
- 5.- por la hormiga *Pogonomyrmex* : **1**.-

Todos ellos fueron estudiados mediante una prolija anamnesis, pruebas cutáneas realizadas de acuerdo a la metodología estandarizada para estos casos, empleando venenos de abeja y de avispa y extractos de cuerpo entero de hormigas colorada, negra y *Pogonomyrmex*, aportadas por los pacientes afectados para asegurar la mayor confiabilidad entre el agente productor y el cuadro alérgico referido. Se cumplimentó el consentimiento informado.

Todos los pacientes poseían una IgE sérica total aumentada por encima de 120 KU/L, que consideramos el límite máximo normal para nuestra población, resultando el promedio de los hallazgos en  $\pm 208,57$  KU/L con un DE  $\pm 26,92$ .

En todos los casos, se realizó la detección de la IgE-específica por ELISA contra el antígeno productor de la reacción clínica. Se fabricaron las fases sólidas correspondientes con los venenos de abeja y de avispa, así como, con los extractos de los cuerpos enteros de las hormigas colorada, negra y *Pogonomyrmex*.

Esta hormiga es común en los desiertos de Norte y Sur América, y, según entomólogos especialistas de la Facultad de Ciencias Naturales de la UBA, posee una toxina muy potente cuya DL50 es de 0,12 mg/kg comparada con el veneno de abeja que es de 2,8 mg/kg



y casi igual al veneno de cobra. Ellos sostienen que el cuadro padecido por nuestra paciente, una niña de 11 años, pudo haber sido tóxico y no alérgico. Hay 67 especies diferentes y fue el investigador Mayr quien la describió por primera vez en 1868. Curiosamente, una avispa del género *Clypeadon* es el predador de esta hormiga a la que paraliza con su veneno y la lleva a su nido para alimentar a sus larvas.

No se ha podido identificar con precisión la especie en nuestro caso, pero la clínica y los estudios inmunoserológicos refuerzan que se trató de una reacción de hipersensibilidad en una niña atópica y no una reacción tóxica. Quizás las subespecies posean modificaciones fisicoquímicas en sus venenos, algunos con mayor o menor potencia tóxica y diferente antigenicidad.

La hormiga colorada o roja de fuego (*Solenopsis invicta*), oriunda de Sudamérica, posee más de 280 especies, y en la actualidad, tiene una distribución casi universal. Fue descrita y estudiada entomológicamente por Buren en 1972.

Los cuadros clínicos padecidos por nuestros pacientes fueron : **choque anafiláctico** para las picaduras de las abejas y avispas, **urticaria aguda** y **angioedema** importante para las hormigas colorada y *Pogonomyrmex*, y **urticaria aguda generalizada** sin angioedema para la hormiga negra.

Todos fueron testificados con los extractos descriptos más arriba, comenzando con altas diluciones de los mismos (1/1.000.000) hasta lograr la positividad cutánea, generalmente, con diluciones de 1/1000 ó 1/10.000. En ningún caso, se produjo una reacción indeseable con la testificación, aunque luego de finalizada la misma, el paciente fue medicado con una asociación anti-H1 y corticoide, cada 12 hs, por ese día únicamente.

El ELISA con los sueros de los pacientes, reveló positividad de anticuerpos IgE específicos en todos los casos, desde 0,35 PRU/mL hasta 1,75 PRU/mL (antiguas clases 1 y 2). Se instauró inmunoterapia específica con el antígeno ofensor por espacio de 3 años; corresponde señalar que este período sólo lo cumplieron aquellos picados por las abejas y las avispas, no así, todas las víctimas de las hormigas, por lo cual, el dosaje de la IgG-específica post-tratamiento, sólo fue posible en los **21** picados por las abejas, en los **4** picados por las avispas y tan sólo en **6** picados por la hormiga colorada y en **1** por *Pogonomyrmex*. Los **4** restantes, suspendieron la inmunoterapia, sin comunicarse con el médico tratante, por lo cual se ignoran los motivos del incumplimiento.

En los ELISA-IgG-específicos, se detectaron niveles elevados de anticuerpos protectores, hasta de 250 UI/mL, para un valor basal o línea de corte nunca superior a 50 UI/mL. Los vacunados con venenos de abeja y de avispa, al cabo de los 3 años, evidenciaban pruebas cutáneas negativas (hasta 1/100) con los extractos originales; los pacientes picados por las hormigas se negaron a ser retestificados, no obstante, poseer anticuerpos IgG protectores. No se incluyó en el estudio de estos pacientes, la picadura provocada en el laboratorio, por carecer de la infraestructura adecuada para desarrollar dicha metodología, que exige el adecuado mantenimiento previo de los insectos a utilizar.

Durante el período restante, hasta 2011, **no** se registraron nuevas consultas de los pacientes tratados, a quienes además, se los instruyó para prevenir nuevas picaduras y exposiciones riesgosas al insecto que le causara el cuadro por el cual consultó oportunamente.

(En la Figura 1, se adjunta un **SDS-PAGE** en el cual se corrieron, separadamente, 20 mcL de los venenos de abeja y de avispa, y de los extractos de hormiga colorada, hormiga negra y hormiga *Pogonomyrmex* empleados en las pruebas cutáneas y en los ELISA, donde se

destacan los péptidos constitutivos de cada uno de ellos, así como, la correspondencia molecular entre los de abeja y avispa, por un lado, y los de las hormigas colorada y negra, por el otro, mientras que la *Pogonomyrmex*, no posee tanta identidad con los de las 2 últimas. Se comparan sus pesos moleculares aproximados, con los estándares habituales, su riqueza polipeptídica y su complejidad fisicoquímica).-

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Britto F. B., Caetano F. H.: «Ultramorphological analysis of the venom glands and their histochemical relationship with the convoluted glands in the primitive social paper wasp *Polistes versicolor*» *Journal of Venoms and Animal Toxins including Tropical Diseases*, 2005; 11 ( 2), 160-174.
2. Fiandor A., Belver M.: Hymenoptera venom allergy: characteristics, tolerance and efficacy of immunotherapy in the pediatric population, *Allergol Immunopathol*, 2009; 37 (3): 109-10.
3. Gmachi M, Kreil G. : Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 ; 90 (8) : 3569-73.
4. Godfray, H.C.J. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA, 1994.
5. King, T.P. , Spangfort, M.D. . Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2000 ; 123: 99-106.
6. Lubin, Y.D. . Changes in the native fauna of Galapagos Islands following invasion by the little red fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1984 ; 21: 229– 242.
7. Michener, Charles D. : In : *The bees of the world*. The John Hopkins University Press. Baltimore, 2000.
8. Murakimi M, Kudo I. Phospholipase A<sub>2</sub>. Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo , Japan *J. Biochem*, 2002 (3): 285-92
9. Franklin N. Adkinson J., Middleton`s Allergy Principles & Practice. 2009 ; 57: 1005-1017.
10. Obispo, T. Nuevos conceptos en la fabricación de extractos de veneno de himenópteros. Departamento de Producción ALK-Abelló, S.A. *Allergol Immunol Clin*, 2002, 17: 215-220.
11. Rodríguez, RJ, Hershey, J., Smith, LJ, , Vick, J, , Hamilton, RG, , Engler, RJM, . WRAMC, Washington, DC. Cross reactivity between bee and snake venoms. *J. Allergy Clin Immunol*, January, 1996.
12. Sun GY, Shelat PB, Jensen MB, He Y, Sun AY, Simoyi A. Phospholipases A<sub>2</sub> and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med*, 2009 , Oct 24.
13. Volcheck, Gerald W. Hymenoptera (apid and vespidae) allergy: update in diagnosis and management. *Current Allergy and Asthma Reports* 2002, 2: 46-50
14. Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, Cao X, Ling C.: Mellitin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induce apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 an inhibiting I $\kappa$ B- $\alpha$  kinase-NF- $\kappa$ B. *J. Biol Chem.*, 2009 ; 284 (6) :3804-13.
- 15.- Fireman P. : *Alergia e Inmunología Clínica*.- Ed. Elsevier-Mosby.- 2007, p.73-76.

- 16.- Regueiro González J.R. : Inmunología. 3ª edición. Edit. Méd. Panamericana.- Buenos Aires.- 2003.
- 17.- Roitt I.M. : Inmunología. 10ª ed.- Edit. Méd. Panamericana. Buenos Aires. 2003.-
- 18.- Grunwald T. : Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). J. Allergy Clin. Immunol., 2006 ; 117 : 848-854.
- 19.- Müller U. : Immunotherapy with honeybee and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. J. Allergy Clin. Immunol., 1992 ; 89 : 529-535.
- 20.- Rueff F : The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Allergy, 1996; 51 : 216-225.
- 21.- Müller U. : Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 2003 ; 3 : 299-303.
- 22.- King T.P. : Structure and biology of stinging insect venom allergens. Int. Arch. Allergy Immunol., 2000 ; 123 : 99-106.
- 23.- Müller U : Recombinant Hymenoptera venom allergens. Allergy, 2002 ; 57 : 570-576.
- 24.- Marcovic-Housley Z. : Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. Structure, 2000 ; 8 : 1025-1035.
- 25.- Soldadova L.N. : Molecular cloning of a new honeybee allergen, acid phosphatase. J. Allergy Clin. Immunol., 2000 ; 105 : S 378.
- 26.- Hoffmann D.R. : Sequence and characterization of honeybee venom acid phosphatase. J. Allergy Clin. Immunol., 2005 ; 115 : S 107.
- 27.- Marz L. : The glycoprotein nature of phospholipase A2, hyaluronidase and acid phosphatase from honeybee venom. Toxicon, 1983 ; 21 : 893-896.
- 28.- Barboni E. : The purification of acid phosphatase from honeybee venom (Apis mellifera). Toxicon, 1987 ; 25 : 1097-1103.
- 29.- Soldadova L.N. : Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus – infected insect cells as compared with Escherichia coli. J. Allergy Clin. Immunol., 1998 ; 101 : 691-698.
- 30.- King T.P. : Allergens of honeybee venom. Arch. Biochem. Biophysics, 1979; 172 . 661-671.
- 31.- Arbesman C.E. : Allergenic potency of bee antigens measured by RAST inhibition. Clin. Allergy, 1976 ; 6 : 587-594.
- 32.- Scott D.L. : Crystal structure of bee venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. Science, 1990 ; 250 : 1563-1566.
- 33.- Hoffman D.R. : Hymenoptera venom proteins. In : Singh BR. Editors. Natural toxins 2 : Structure, mechanism of action and detection. New York, Plenum Press, 1996 ; 169/186.

+++++\*\*\*\*\*+++++

## IgE ANTIBODIES AGAINST THE HBsAg IN HUMANS

Ángel Alonso

### INTRODUCTION.

During the 1940 decade and after the II<sup>o</sup> World War (1939-1945) a new concept about hepatitis and liver damage was born. A second form of the illness was discovered with very important epidemiological differences with the previous infectious hepatitis (type A) with fecal-oral transmission. This new form was acquired by blood transfusion, sexual intercourse, drug intravenous addiction and in kidney dialysis units. <sup>(1-2-3-4-5)</sup>

Electronic microscopy revealed a new ADN virion that was baptized as the hepatitis B virus (HBV) different from the ARN type A hepatitis virus. Three different types of particles were detected : 1): the 42 nm Dane's intact virion; 2): the rounded 22 nm one and 3): the filamentous structures with 250-300 nm in length and 22 nm in width.

These particles show in their surface a glycoprotein envelope of 24 kDa which is antigenic and was formerly named the Australian antigen and nowadays the HBsAg.

Besides this antigen another components of the virion play an important role in the pathogenic and immunological responses such as the core-antigen (HBcAg) or nuclear capsid, a phosphoprotein of 22 kDa with ADN polymerase and reverse transcriptase activities and a pre-core polypeptide named HBeAg. <sup>(6-7-8-9-10-11-12-13)</sup>

There are at least 5 specificities of the HBsAg with one specific group determinant named "a" and subtype determinants that exclude each other such as "d/y" and "w/r". Thus several subtypes are constituted : ayw, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4 and adr.

In North and South Americas predominate adw meanwhile in other regions of the World preponderate other determinants who make possible to establish the origin of an outbreak of the illness. <sup>(14-15-16-17-18-19-20)</sup>

It was demonstrated that the core antigens as well as those of the envelope (S, Pre-S1 and Pre-S2) are recognized by specific antibodies and T-lymphocytes in the major histocompatibility complex (MHC) context which varies according to the individual phenotype. It would explain the case of the "non-responders" to the vaccine and constitutes an interesting research with new protective vaccines with antigens of the Pre-S region, for example. <sup>(21-22-23-24-25-26-27-28-29-30)</sup>

The WHO estimates that chronic carriers of HBV in the world are approximately 300.000.000 people the majority of which are asymptomatic having the virus in their blood (the highest load), in the semen and in other fluids or secretions.

A close familiar contact with a chronic carrier has 25% of chance to acquire the infection and although the rate of recovery is high (less than type A hepatitis) the change to a chronic state and the remote possibility to develop a hepatocarcinoma justify all the efforts to prevent the HBV infection.

The prevention of HBV infection may be active (vaccines) or passive (standard gammaglobulin or the hyperimmune one).

In 1970, a serum with HBV was inactivated by boiling, diluted 1/10 and injected in healthy volunteers who developed strong protection against the wild HBV.

In 1981, Szmunes obtained the legal permission for the first generation vaccines without ADN and with 22 nm particles of HBsAg treated with phormol that induced protective and long-lasting antibodies with three dosis of 20 mcg/ml each.

The second generation vaccines were worked out in yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* in order to avoid the remote possibility to inject other unknown viral pathogens with plasmids and the non glycosilated part of the S gen of the HBsAg. Particles of 20 nm

treated with phormol are very immunogenic but did not cover the 100% of the vaccinated population.

The third generation vaccines are elaborated in mammalian cells with recombinant techniques using the S antigen and the regions pre-S1 and pre-S2.

Nowadays, other strategies are carried out to overcome the difficulties of those “non-responders” patients. The Nacional Schedule of Vaccinations recommends the use of the HBsAg vaccine in the newborn 12 hours after birth specially if prematurity is present and three doses at the second, fourth and sixth month afterwards. In the normal newborn these 3 doses must be applied at birth, at the second month and the third at the sixth month. <sup>(31-32-33-34-35-36-37-38-39-40-41)</sup>.

This same schedule must be applied to non-vaccinated adults.

Our investigation was planned to prove if vaccinated subjects as well as those patients who suffered acute B hepatitis synthesized specific IgE antibodies against the HBsAg whether they were atopic or not.

### **MATERIALS AND METHODS.**

1.- *Antigen (vaccine)* : all the subjects received three doses of the HBsAg vaccine (20 mcg each) (Aventis-Pasteur). The laboratory gave us 20 mcg of the purified antigen without adjuvants or conservatives for skin testing and for the solid phase of the ELISA.

2.- *Patients* : they were divided into four groups according to their personal history and clinical records.

**Group 1** : non atopic/non allergic subjects.

They were 25 healthy adults, aged 22 to 51 years old, 8 females and 17 males who have been vaccinated with three doses of HBsAg. They did not suffer any respiratory or dermatologic condition of allergic origin. They have no parents or relatives with allergies and their normal serum IgE levels were found between  $33 \pm 17$  KU/L.

The skin testing with conventional aero-allergens (pollens, moulds, mites & cockroaches) were absolutely negative.

They were not taken antihistamines, glucocorticoids, immunosuppressors, other vaccines or gammaglobulin during the research. A blood sample was taken from the vein of the elbow to check the presence of specific IgG and IgE antibodies against the HBsAg.

**Group 2** : atopic/allergic patients.

They were 25 atopic subjects, aged 18 to 39 years old, 6 females and 19 males, who have been vaccinated with three doses of HBsAg. They suffered perennial rhinitis, hay fever or stationnal rhinoconjunctivitis and bronchial asthma with familiar history of similar illnesses and with high serum IgE levels between  $220 \pm 40$  KU/L.

Three subjects who suffered acute hives and angioedema after the third dose of the HBsAg vaccine induced us to study the atopic specific reaction to the antigen.

The immediate hypersensitivity skin tests were positive to house-dust mite, pollens, moulds and cockroaches. They were receiving specific immunotherapy with allergens and pharmacotherapy with anti-H1 antihistamines and/or beta-agonists aerosols as well as antiinflammatory inhaled devices. They did not receive other vaccines or immunomodulator agents.

**Group 3** : non atopic/non allergic subjects who suffered and recovered from their acute B hepatitis.

They were 20, 4 women and 16 males, aged 27 to 44 years old who belonged to the Hospital staff but that were not vaccinated in the past.

They had specific IgG antibodies (anti-HBsAg  $\geq 10$  mUI/mL ) and two of them also had anti-HBcAg or anti-core antibodies. The 20 subjects had normal liver tests and had no respiratory nor dermatological illnesses.

They had no familiar background of atopy and their serum IgE was within normal limits ( $48 \pm 11$  KU/L) and their skin tests with aero-allergens were negative. They were not taken antihistamines, glucocorticoids, immunosuppressors, other vaccines or gammaglobulin during the research.

**Group 4** : atopic/allergic patients who suffered and recovered from their acute B hepatitis.

They belonged to the Hospital staff that were not vaccinated with HBsAg, some received blood supplies for a car crash and some have been recovered from parenteral drug abuse. They were 20 subjects, 13 men and 7 women, aged 32 to 51 years old with a serum IgE of  $190 \pm 45$  KU/L and a IgG-anti-HBsAg  $\geq 10$  mUI/ml without IgG-anti-HBcAg or anti-core antibodies.

They suffered perennial rhinitis, hay fever or seasonal rhinoconjunctivitis and bronchial asthma with familiar history of similar illnesses. The immediate hypersensitivity skin tests were positive to house-dust mite, pollens, moulds and cockroaches. They were receiving pharmacotherapy with anti-H1 antihistamines and /or beta-agonists aerosols as well as antiinflammatory inhaled devices. They did not receive other vaccines or immunomodulator agents and had normal liver tests.

### 3.- Skin testing with HBsAg.

A solution containing 1 mcg/mL of pure HBsAg was used in intracutaneous tests (0.025 ml each) in the skin of the arm in sterile conditions and after the informed consent was signed. Positive (histamine 1/1000) and negative (saline solution pH 7,2) controls were done. The skin tests were evaluated at 20 minutes in their wheal and flare reactions employing the conventional schedule used for aero-allergens. A positive reaction was considered when the wheal and flare reactivity was  $\geq 20$  mm with a negative saline solution control.

### 4. Measurement of IgE anti-HBsAg by ELISA and the RAST-inhibition.

ELISA assays were performed on single samples as described previously by Ceska with some modifications. <sup>(46-47)</sup>

Briefly, a microtitre plate was coated with 50  $\mu$ l per well (100 mcg/mL in sodium carbonate buffer pH 9.6) of HBsAg, incubated at 37° C for 90 min and blocked with 3 % defatted milk on 0.1 M PBS.

After washing the wells were incubated with 100  $\mu$ l of a 1/10 dilution of human positive pooled sera overnight at 37° C. After additional washing with PBS-T, 100  $\mu$ l of a 1/2000 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-human IgE was added to each well for 2 hs at 37° C.

The reaction was developed with o-phenyldiamine in citrate buffer, pH 4.6, and hydrogen peroxide. The absorbance was read at 492 nm utilizing a manual ELISA reader. Each assay was run in three separately prepared duplicates.

For the RAST-inhibition the methodology described by Gleich was used with the HBsAg as the main antigen. In order to assess specificity we used common allergens such as ragweed, grass pollens and cat epithelia.

The Phadebas RAST Units scale was used as follows : less than 0.35 PRU/mL without significance ; between 0.35 – 0.70 PRU/mL with significance meaning the presence of a specific IgE corresponding to the old nomenclature of class 1 ; between 0.70 – 3,50 PRU/mL corresponding to class 2 ; between 3,50 – 17 PRU/mL that represents class 3 demonstrate high specific IgE antibodies and over 17 PRU/mL is class 4 with the highest titer of the antibodies. (Although classes 5 and 6 are described we did not considered them in our scales).

### 5.- Measurement of IgG-anti-HBsAg and IgG-anti-HBcAg antibodies.

These antibodies were checked by the Hospital Lab as a routine determination in vaccinated subjects as well as in liver disease patients. To be included in our four groups the patients must have a serum IgG-anti-HBsAg.

### 6.- Statistical analysis.

They were run with SPSS for Windows. Fisher's exact test and independent t test were used for inter-group comparisons. A p value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. <sup>(21)</sup>

## RESULTS.

They may be summarized as follows :

**Group 1 :** the non-atopic patients that received the three doses of vaccine had titers higher than 10 mUI/mL of IgG-anti-HBsAg in their sera. The skin tests with aero-allergens were negative in all the 25 subjects and only two of them showed a positive wheal and flare

reaction with HBsAg with 5-9 mm in size. These two patients also had a IgE anti-HBsAg antibody with 0.35 PRU/mL.

**Group 2** : these atopic patients properly vaccinated also had a titer of IgG-anti-HBsAg higher than 10 mUI/mL in their sera. In this group, 14/25 subjects showed positive skin tests with HBsAg with wheal and flare reactions between 5 to 14 mm in size.

Twelve of the fourteen positive patients had a IgE-anti-HBsAg antibody with titers between 0.35-0.70 PRU/mL meanwhile the remaining two had titers of 0.33 and 0.29 PRU/mL under the value considered positive.

Neither local nor systemic reactions to skin testing were suffered by the 25 patients.

**Group 3** : these 20 patients did not show abnormal results of their liver biochemical parameters although all of them had IgG-anti-HBsAg antibodies with titers higher than 10mUI/mL and only two of them also had IgG-anti-HBcAg or anticore antibodies. They had no IgE-anti-HBsAg antibodies (values between 0.04 to 0.12 PRU/mL) as well as negative skin tests with HBsAg.

**Group 4** : these 20 patients did not show abnormal results of their liver biochemical parameters although all of them had IgG-anti-HBsAg antibodies with titers higher than 10 mUI/mL but no IgG-anti-HBcAg or anticore antibodies.

Only two of them had IgE-anti-HBsAg with values between 0.40 and 0.55 PRU/mL. These patients also showed positive skin tests to HBsAg with 5 to 9 mm in size.

*RAST-inhibition* : this technique reinforced the results obtained with the specific IgE-anti-HBsAg antibodies in all the positive sera.

( **Table I.** ).

## **DISCUSSION.**

Epidemiological studies developed 30 years ago clearly demonstrated that there are differences between the mechanisms of hepatitis transmission. Type A is acquired by the oro-fecal way through water and foods contaminated with the virus meanwhile type B is acquired by human fluids like blood and semen and all the devices contaminated with them (needles, syringes, etc). <sup>(31-32-33-34-35-36-37)</sup>.

The HBsAg was formerly detected by Blumberg in the serum of an Australian aborigine. In the research of new serum alloantigens he proved the Australian antigen with the serum of two haemophilic patients that had been received several blood transfusions. Thus, specific antibodies were discovered in the sera of inpatients that had been repeatedly transfused in whom hepatitis was frequently diagnosed.

The discovery of the HBsAg reinforced the old suspicion of the different origin of hepatitis and made possible the serological diagnosis of the acute or chronic states.

In the pathogenesis of B hepatitis the pre-S1 and pre-S2 antigens play an important role once they introduce into the hepatocyte and duplicate their genetic material.

The destruction of liver tissue are due to 1): direct cytopathic action and 2): immune cytotoxicity induced by LTCD8+ cells and nature killer cells at the centrolobulillar areas.

In immunodeficient patients there is low liver cytolysis and more chronicity; on the other hand, with adequate immune response the cytolysis is worse and the carrier state does not develop. The HBsAg can produce a chronic hepatitis with a lymphocytic infiltrate and a centre lobulillar necrosis for more than six months. The gold standard diagnosis depends upon the liver biopsy.

Chronically the active B hepatitis can induce a cirrhosis state and occasionally a liver carcinoma. Thus, the importance of hepatitis B vaccination in the general population and its inclusion in the National Program of Vaccinations.

Between the interaction of the HBsAg and the immune system specific antibodies and lymphoid cytotoxic cells are performed. The specific antibodies appear chronologically during the first ten days after the infection with IgM-anti-HBsAg, anti-HBcAg and anti-HBeAg following by the IgG-anti-HBsAg, anti-HBcAg and anti-HBeAg.

With the vaccine (HBsAg) an IgM and IgG response against the viral envelope is measured as a routine laboratory test. An identical response happens with other viruses that attack liver tissue, for example, Epstein-Bärr, cytomegalovirus, herpes simplex I, varicella-zoster

and a flavivirus such as yellow fever.

Nowadays some researches reinforced the idea that HBsAg vaccine must be applied to those suffering a chronic active B hepatitis to induce specific antibodies by the parenteral route to "cool-down" the liver inflammation. The same attitude is recommended to those "non-responders" duplicating the doses with short periods of vaccination controlling the serological immune response.

In our patients a previous diagnosis of the existence of IgG specific antibodies was necessary to assess that the HBsAg had induced an immune response independently or not of the atopic condition. Thus, we detected a IgE-anti-HBsAg in 2/25 non atopic vaccinated patients with values of 0.35 PRU/mL in RAST meanwhile the atopic group revealed 12/25 positive patients with a specific IgE antibody with values between 0.35 and 0.70 PRU/mL and other 2 patients with positive skin tests to HBsAg but RAST – IgE less than 0.35 PRU/mL.

This is the first report about the existence of a IgE specific antibody against the HBsAg in the vaccinated atopic population as well as in the atopic patients that suffered acute hepatitis. In this last group the titer of these antibodies and the number of patients who synthesized them were lower than those of the vaccinated group.

In the groups 3 and 4 the patients that restore to health revealed that non atopic patients did not have specific IgE antibodies meanwhile the atopic patients (2/20) showed titers of 0.40 and 0.55 PRU/mL.

These findings support the idea that healthy atopic subjects can produce a specific IgE-anti-HBsAg more intensely in those vaccinated than in those who suffered the active hepatitis. This peculiar difference is not easy to explain. It is probable that during the acute liver infection some pathways involving the viral processing and the ulterior LT activation will interfere the IgE synthesis and focused a IgM and IgG protective response.

Perhaps the viral inoculum compared with the HBsAg vaccination quantity is not significant to induce a IgE response in a opposite situation with the helminthic antigens.

We also can not explain if the presence of specific IgE antibodies plays any role in the development of chronic hepatitis considering that the synthesis of the IgE promotes the release of chemical mediators such as histamine and leukotrienes and proinflammatory cytokines such as IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 and even platelet serotonin.

#### **REFERENCES.**

- 1.- Gorbach S.L. : Guidelines for infectious diseases in primary care. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, 1999; 322-323.
- 2.- Schaechter M. : Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Ed. Méd.Panamericana. 1994; 550-562.
- 3.- Hollinger F.B. : Proceedings of the 1990 international symposium on viral hepatitis and liver disease. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. 1991.
- 4.- Koneman E.W. : Diagnóstico microbiológico. Ed. Méd. Panamericana. 1992; 784-808.
- 5.- Gilligan P.H. : Cases in medical microbiology and infectious diseases. American Society for Microbiology. Washington, 1992.
- 6.- Braude A.I. : Microbiología clínica. Ed. Méd.Panamericana., 1988; 717-721.
- 7.- Lennette E.H. : Manual de Microbiología Clínica. Ed. Méd. Panamericana, 1989; 1013-1036.
- 8.- Jawetz E. : Microbiología médica. Ed. El Manual Moderno, México, 1992; 487-498.
- 9.- Oubiña J.R., Carballal G. : Virología médica. Ed. El Ateneo, 1991; 295-322.
- 10.- Cabello R.: Microbiología y parasitología humanas. Ed. Méd. Panamericana, 1999; 158-162.
- 11.- Pérez Arellano J.L. : Guía de autoformación en enfermedades infecciosas. Ed. Méd. Panam., 1996; 459-475.
- 12.- Davis B., Dulbecco R. : Tratado de Microbiología. Ed. Masson. 1996; 1037-1048.
- 13.- Joklik W.K. : Microbiología de Zinnser. Ed. Méd. Panam., 1994; 1387-1396.
- 14.- Finegold S.M., Martin W.J. : Diagnóstico microbiológico de Bailey-Scott. ,1983; 385-391.



- 15.- Mathet V., Oubiña J.R. : Secuencia nucleotídica parcial de una cepa del agente GBV-C/virus de la hepatitis G. – VIII° Congreso Argentino de Microbiología.- 1998; 266.
- 16.- Quarleri J.F., Oubiña J.R. : Caracterización genòmica de cepas del virus de la hepatitis C no tipificables mediante RFLP. – VIII° Congreso Argentino de Microbiología, 1998; 266.
- 17.- Cruciani J.A. : Asma y síndromes alérgicos. Ed. El Ateneo. 1941.
- 18.- Varela Fuentes B : Alergia en la práctica clínica. Espasa Calpe Arg., 1946.
- 19.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H., Varela M.R. : Alergia atópica. Edit. H. Macchi, 1987.
- 20.- Benjamín E. : Immunology : a short course. Ed. Wiley Liss, 1991.
- 21.- Bradford Hill A. : Texto básico de estadística médica. Ed. El Ateneo., 1980.
- 22.- O.P.S. : Enfermedades alérgicas e inmunológicas. 1989.
- 23.- Kitamura Y. : Biological and molecular aspects of mast-cell and basophil differentiation and function. Raven Press. New York. 1995.
- 24.- Gras J. : Mecanismos inmunológicos. Edit. JIMS. Barcelona. 1972.
- 25.- Wolfromm R., Charpin J. : Alergia. Ed. Espaxs. Barcelona. 1973.
- 26.- Lauter H. : Las alergias. Edit. Everest. 1996.
- 27.- Fitzgibbon J. : Las alergias y su tratamiento. Ed. Paidós. Buenos Aires. 1999.
- 28.- Sheldon J.M. : A manual of clinical allergy. Ed. W.B.Saunders. Filadelfia. 1953.
- 29.- Benacerraf B. : Inmunología. Ed. Méd. Panamericana. 1986.
- 30.- Gell P., Coombs R., Lachmann P. : Clínica inmunológica. Ed. Salvat. 1980.
- 31.- Barrett J.T. : Inmunología Básica. Ed. Méd. Panamericana. 1978.
- 32.- Farrerons Co F.J. : Alergia y paraalergia. Ed. Espaxs. 1987.
- 33.- Roitt I., Brostoff J. : Immunology. Ed. Mosby. London. 1998.
- 34.- Becker E.L. : Biochemistry of the acute allergic reactions. Ed. Alan R. Liss. New York. 1981.
- 35.- Ruiz Moreno G. : Lecciones de alergia. Ed. López & Etchegoyen. Buenos Aires. 1957.
- 36.- Suites D.P., Terr A. : Inmunología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. 1993.
- 37.- Rose N. : El laboratorio en inmunología clínica. Ed. Médica Panamericana. 1984.
- 38.- Lahita R.G. : Textbook of the autoimmune diseases. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2000.
- 39.- Regueiro González J.R. : Inmunología. Ed. Médica Panamericana. 2003.
- 40.- Playfair J., Chain B. : Inmunología en esquemas. Ed. CTM., 2007.
- 41.- Abbas A.K. : Inmunidad celular y molecular. Ed. Elsevier. 2004.
- 42.- Roitt I. : Inmunología. Fundamentos. Ed. Médica Panamericana. 2003.
- 43.- Alonso A. : Temas de Inmunoalergia. Edit. CTM. Tomos I al VI. Buenos Aires. 1998-2006.
- 44.- Alonso A. : Fundamentos de alergia para el médico general. Edit. El Ateneo. Buenos Aires. 1996.
- 45.- Alonso A. : Claves de la Inmunología. Ed. López. Buenos Aires. 1992.
- 46.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976; 72: 248-255.
- 47.- Ceska M., Ericsson R. : Radioallergosorbent assay of allergens. J.Allergy Clin. Immunol., 1972; 49 : 1

+++++\*\*\*\*\*+++++

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, ya sea en adultos o en niños, y constituye una de las 3 causas de muerte más frecuente en el mundo. Se lo podría definir como un conjunto de enfermedades, en las que nuestro cuerpo produce, al igual que otros sistemas biológicos, u otras especies, exceso de células, que derivan de tejidos normales que sufrieron transformaciones, mutaciones y divisiones con una proliferación incontrolada, cambios del metabolismo y la diferenciación celulares, originándose una masa denominada tumor. Esas células transformadas pueden invadir tejidos vecinos y colonizar sitios distantes al tejido de origen, desplazándose a otras partes del cuerpo, en un proceso llamado metástasis. Diariamente se generan en el organismo células que sufren mutaciones las cuales pueden llegar a desencadenar un proceso neoplásico, pero eficientes mecanismos de control, inducen la apoptosis de la propia célula, por la llamada vigilancia inmunológica. Los resultados de algunos experimentos cuestionan la existencia de la inmuno-vigilancia, cuya función varía de acuerdo a los distintos tipos de tumores. De todas maneras, es evidente que el sistema inmune reacciona frente a ellos, y se investiga como poder llegar a magnificar estas reacciones para destruir a los cánceres de una manera específica.

**NEOPLASIAS:** definición y características generales.

La proliferación y diferenciación de las células de los organismos pluricelulares siguen un programa genético que está regulado por estímulos extracelulares. Alteraciones en este sistema de regulación, que no se conocen completamente, parecen constituir la base genética del cáncer, que se entiende como una acumulación de mutaciones que afectan a las células somáticas durante la vida de un organismo y hacen que estas proliferen de forma incontrolada. Varios pasos serían necesarios para transformar una célula normal en una célula cancerosa. La mayoría de los cánceres comienzan en una sola célula, la cual, ha tenido que acumular mutaciones en varios genes diferentes antes de llegar a formar un cáncer, tales como errores en la duplicación celular del ADN, la acción de ciertos agentes químicos o ionizantes, factores hereditarios, e interacción de ciertos agentes virales con el genoma de la célula huésped, entre los más conspicuos.

El término neoplasia significa de acuerdo a su etimología: "tejido de nueva formación". Esto nos dice poco sobre su naturaleza biológica. Entre las definiciones explicativas, la más aceptada es la que formuló Ewing en 1930, según la cual, es un crecimiento proliferativo, relativamente autónomo de un tejido.

Esta definición contiene 3 elementos esenciales: 1): el carácter de crecimiento proliferativo, 2): el carácter tisular y 3): el carácter de autonomía relativa.

El crecimiento proliferativo implica un aumento en el número de células debido a una tasa mayor de división y/o a una tasa menor de muerte que la de los tejidos normales. El tisular significa que el término neoplasia es definido para entidades pluricelulares. De este modo, por esta definición, los organismos unicelulares estarían libres de esta enfermedad. El carácter de autonomía hace referencia a que las células neoplásicas se dividen sin estar sujetas o reguladas por los mecanismos que controlan la división de las células normales en el mismo organismo.

El adjetivo "relativo" aplicado al término autonomía suaviza su carácter, destacando que si bien las células que proliferan no se ajustan por completo al control de los mecanismos reguladores de los organismos, ello no significa que desconozcan todas las señales que en él operan.

Hay casos en los cuales el carácter autónomo de una neoplasia es muy tenue y solo relativo al tejido en el cual ha surgido. El carácter de autonomía relativa es el rasgo distintivo de las neoplasias por el que se diferencian de otras proliferaciones como las inflamaciones, las regeneraciones y las hiperplasias.

Los crecimientos proliferativos compensadores como las regeneraciones o inflamaciones, contribuyen a la preservación y a la defensa del organismo, por lo que no son ajenos a las reglas que controlan la proliferación celular y la organización del individuo.

Las hiperplasias constituyen una respuesta a una carencia de tejido o a una mayor demanda de él, o a un efecto de una alteración hormonal. En cualquier caso, la hiperplasia no posee el carácter de autonomía, ya que depende de un estímulo funcional para su aparición y desaparece cuando aquél desaparece.

De acuerdo a sus características y a su comportamiento en el organismo se pueden diferenciar 2 tipos de neoplasias, las benignas o tumores benignos y las malignas o cánceres.

Las primeras permanecen localizadas estrictamente en su tejido de origen y, en la mayoría de los casos, no amenazan la vida del individuo y pueden ser removidas por la cirugía. Por otro lado, las neoplasias malignas tienen la capacidad de invadir tejidos distintos al de origen, ya sean éstos contiguos o distantes; en este último caso, cuando el tumor se ha diseminado a tejidos distantes, sin contigüidad con el tejido de origen, se habla de metástasis.

### **Los tipos de cánceres.**

Las neoplasias malignas o cánceres pueden ubicarse en 3 grupos diferentes de acuerdo a su origen histológico: carcinomas, sarcomas y leucemias y/o linfomas.

Los carcinomas tienen su origen en los epitelios, es decir en las capas de células que recubren la superficie del cuerpo, las mucosas y las diversas glándulas. Se trata sin duda del tipo de cáncer más común y responsable del mayor número de muertes, siendo los más frecuentes, los de pulmón, mama, colon, próstata, vejiga, etc.

Los sarcomas son cánceres menos frecuentes que tienen su origen en las estructuras de sostén derivadas del mesodermo, como los huesos, músculos, vasos sanguíneos, etc. Si el sarcoma tiene su origen en el hueso se llama sarcoma osteogénico u osteosarcoma; si deriva de un cartílago se denomina condrosarcoma, y si se origina en el tejido fibroso se llama fibrosarcoma.

Las leucemias y los linfomas tienen su origen en las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea.

Hay clasificaciones mucho más específicas y rigurosas de los tipos de cánceres, en los cuales se toma como criterio el órgano en el cual se originó y el tipo de células implicadas dentro de este órgano. De acuerdo a estas clasificaciones, hay aproximadamente unas 200 variedades de la enfermedad. A diferencia de las leucemias, que crecen en forma diseminada, los carcinomas, sarcomas y linfomas crecen como una masa relativamente compacta, por lo que se los denomina tumores “sólidos”.

Estos tumores, como también los tumores benignos, tienen 2 componentes básicos en su estructura: las células neoplásicas proliferantes que constituyen el parénquima, y, su estroma de sostén, constituido por el tejido conectivo y los vasos sanguíneos. El estroma es esencial para el crecimiento y la propagación del tumor dado que le provee de nutrientes, factores de crecimiento y citoquinas. Se sugirió que el estroma podría actuar como una barrera para la presentación antigénica y el reconocimiento por parte del sistema inmune.

### **Qué es un tumor: descripción.**

Un tumor se podría definir como un conjunto de células que crecen y se dividen con una velocidad mayor que las normales rompiendo el equilibrio <sup>[1]</sup>. Hay tumores benignos y malignos. Los primeros no son invasivos, suelen estar encapsulados y al crecer sus células no se dirigen hacia otros tejidos; por lo tanto, operándolos desaparecen totalmente del organismo.

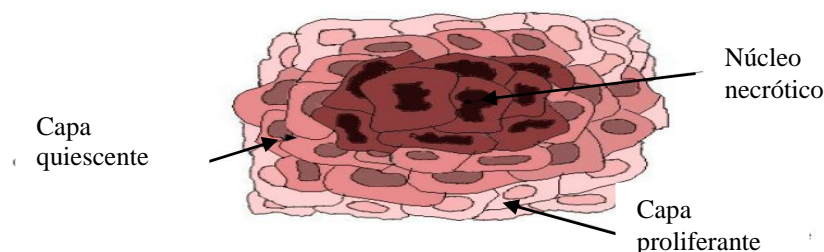
Por otro lado, las células de los tumores malignos presentan hiper-proliferación, y al crecer, invaden y destruyen otros tejidos, evadiendo la apoptosis, creando su propia red vascular y, en algunos casos varias de sus células se desprenden de él, viajan por el torrente sanguíneo o por los vasos linfáticos, y se depositan en otros tejidos. A este fenómeno se le conoce como metástasis. Una vez que un tumor maligno se ha metástasizado, se encuentra en varias partes del organismo, y la mayoría de las veces las metástasis no pueden ser

detectadas por métodos clínicos debido a su tamaño, siendo esta una de las razones por las cuales estos tumores son muy difíciles de erradicar por completo del cuerpo, pues sólo son clínicamente detectable si alcanza la acumulación de  $10^8$  células aproximadamente.

Fue Hipócrates (460/370 BC), padre de la Medicina, quien utilizó por primera vez los vocablos griegos karkinos y karkinoma (que significa cangrejo) para este tipo de tumor, pues su morfología le recordaba a dicho animal; luego el médico romano Celsius (28/50 BC) lo tradujo al latín como cáncer. Aunque el nombre se le atribuye a Hipócrates, este tipo de tumor ya se había observado antes, pues hay registros del cáncer de mama en los papiros egipcios.

Las evidencias demuestran que los tumores malignos se originan a partir de la acumulación de mutaciones en una sola célula [1]. La carcinogénesis está ligada a un cambio en la secuencia del ADN (mutagénesis), la que se da por factores físicos, químicos, genéticos y ambientales del individuo, por ejemplo, el cigarrillo, el alcohol, la obesidad, la vejez, el contacto con químicos carcinogénicos (asbesto, arsénico), la exposición a las radiaciones (rayos X o UV), los virus (del papiloma humano o VPH, de las hepatitis B o C, de Epstein-Barr), etc.

En los tumores cancerosos se conocen 3 estadios [2]: el avascular, el vascular y el metastásico. Un tumor avascular, es aquel que se desarrolla en ausencia de vasos sanguíneos. En los experimentos in vitro estos tumores se asemejan a agregados esféricos, pero las razones de esto no son muy claras. Obtienen sus nutrientes y se deshacen de sus desechos metabólicos por medio de un transporte difusivo; cuando el tumor es pequeño, este proceso es suficiente para que a toda célula le llegue alimento, y así, el agregado crece exponencialmente [3], pero al crecer, los nutrientes, en especial el oxígeno, son absorbidos por sus capas más externas y el proceso difusivo no es suficiente para proveer las sustancias a las células del interior del tumor, lo que da como resultado 3 regiones bien diferenciadas: las células del centro, al no tener alimento mueren, formando una capa interna llamada núcleo necrótico; las células inactivas que se encuentran en el medio del tumor crean la capa quiescente, y, más externamente están las células que se dividen de la capa proliferante. (Fig. 1).



**Fig 1.** Capas del tumor avascular. Debido a que los nutrientes llegan al tumor avascular por medio del transporte difusivo, al aumentar su tamaño, este proceso no es suficiente para suministrar de nutrientes a sus células más internas y se forman 3 capas o regiones: núcleo necrótico, capa quiescente y capa proliferante.

Estos agregados crecen hasta alcanzar un tamaño de 1 a 2 mm de diámetro, el cual está dado por el balance entre las células muertas del interior y las células proliferantes. Con ese tamaño, el tumor entra en latencia y deja de expandirse [7], aunque es metabólicamente activo; el tiempo que permanece en este estado depende del tipo de cáncer del que se trate.

Fue Folkman (1933/2009), quien a principios de 1960, trabajando con tumores cancerosos en los laboratorios de la marina estadounidense, se percató que los tumores en cultivos in vitro, sólo crecían hasta un determinado tamaño y se morían, a diferencia de los tumores implantados en ratones, los cuales crecían desmesuradamente.

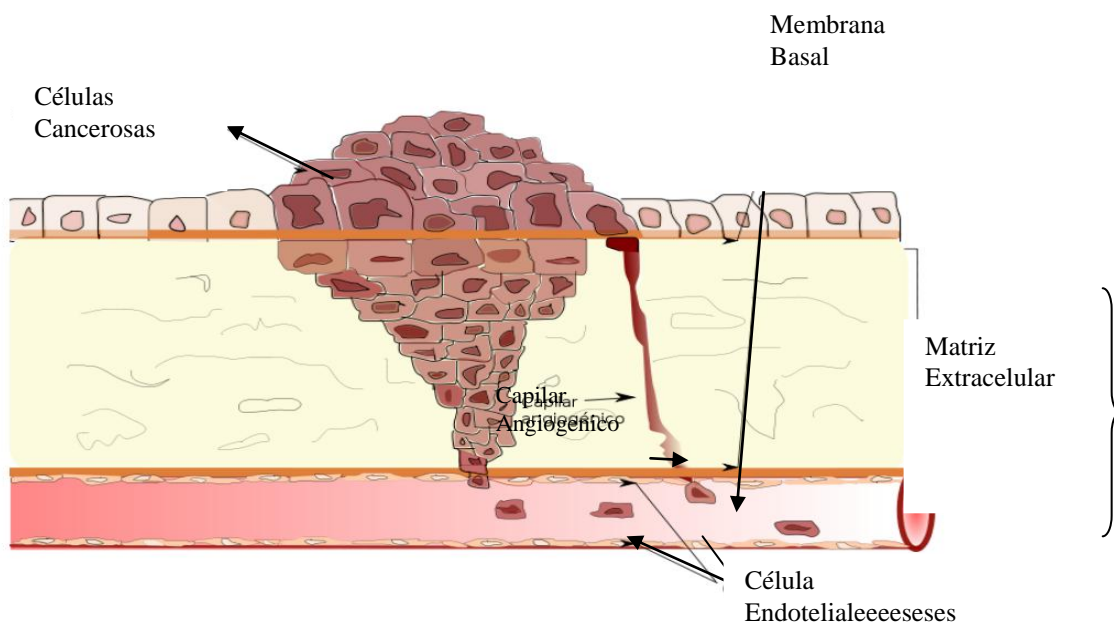
La diferencia entre unos y otros, era que los segundos habían sido capaces de generar su propia red vascular a partir de los capilares existentes en los tejidos vecinos, obteniendo así el medio para su alimentación y excreción (fase vascular del cáncer), y los primeros, al estar en un medio artificial, no tenían como obtener nutrientes para seguir creciendo.

Así, Folkman y su equipo, propusieron en 1971, al Instituto Nacional de Cancerología de EEUU su hipótesis, en la que sostenía que el crecimiento de los tumores cancerosos dependía de la red vascular que ellos generaban, y por lo cual, al inhibir este proceso conocido como angiogénesis, se podría combatir el cáncer. Para la comunidad científica esta hipótesis parecía ridícula, y no fue aceptada; para ese tiempo ya era conocido que los tumores presentaban angiogénesis, pero se suponía que ésta era dependiente de la inflamación, y no del tumor mismo [4].

A pesar de esto, Folkman y sus colegas, entre ellos Gimbrone [10], siguieron realizando experimentos para demostrar la veracidad de su supuesto. Algunos de ellos consistían en injertar un tumor en la córnea de los ratones, y observar la respuesta de los vasos sanguíneos de los alrededores. Así, valoraron en detalle el proceso de la angiogénesis tumoral, pues al estar el tumor implantado en este tejido permitía que los vasos sanguíneos fueran más visibles.

Luego de 10 años de que Folkman sugirió su hipótesis, los científicos empezaron a darle credibilidad, pues fue el primero en aislar una proteína segregada por el tumor que estimulaba el desarrollo de una red vascular, a partir de los vasos sanguíneos proximales. Así se demostró que la vasculatura que adquiere el tumor es dependiente del tumor mismo y de los vasos cercanos. Hoy en día, los científicos dedicados al estudio del cáncer aceptan lo propuesto por Folkman y sus colaboradores.

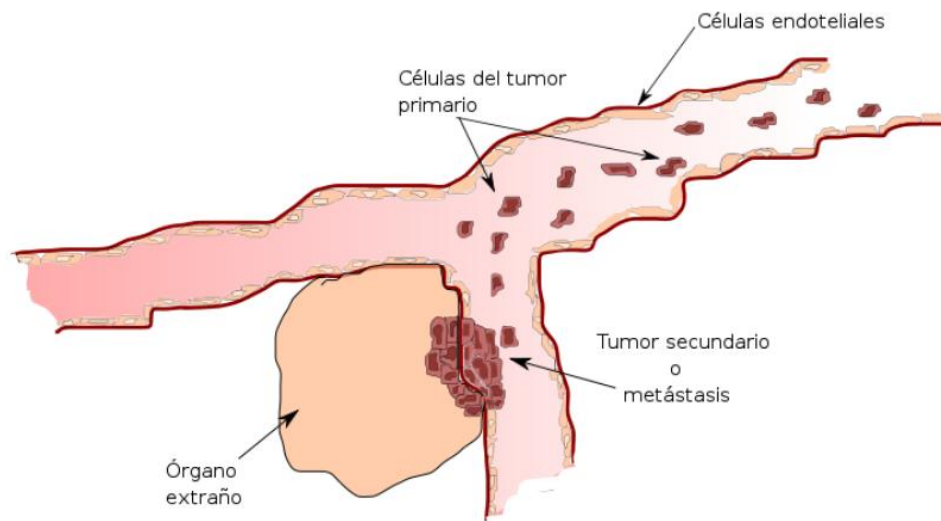
Por último, la etapa metastásica, es la fase en la que las células cancerosas invaden otros tejidos y vasos, por la interrupción de los mecanismos de adhesión que mantienen juntas a las células del tumor, permitiendo que se desprendan de éste. Son capaces de atravesar la membrana basal, la matriz extracelular y la capa de células endoteliales para llegar hasta un vaso sanguíneo o linfático penetrándolo. (Fig.2.)



**Fig 2.** Las células del tumor atraviesan la membrana basal, la matriz extracelular y la capa de células endoteliales logrando así penetrar un vaso sanguíneo o linfático, liberándose a la circulación.

Al llegar al vaso, las células se liberan a la circulación sanguínea o linfática, y así viajan por el organismo deteniéndose en órganos preferenciales, dependiendo del tipo de cáncer del que se trate (aún no se sabe que determina esa preferencia). Cuando llegan al órgano se adhieren a través de las moléculas de adhesión [9], atraviesan su endotelio por medio de enzimas y penetran en él. Ahí forman un pequeño conglomerado de células llamado micro-metástasis. Finalmente, estas células proliferan (como la célula madre de la cual provienen), colonizando este nuevo tejido [6]. Al tumor formado se le conoce como tumor

secundario o metástasis, y al tumor del cual provienen se le conoce como tumor primario. Las metástasis llegan a otras partes del organismo no solo por los vasos sanguíneos y linfáticos sino que se pueden propagar por las membranas o por simple contacto entre los órganos. (Fig. 3).



**Fig 3.** Las células que se desprenden del tumor primario viajan por el torrente sanguíneo adhiriéndose a órganos por medio de las moléculas de adhesión; atraviesan su endotelio, proliferan y forman un nuevo agregado de células cancerosas conocido como tumor secundario o metástasis.

Para metastatizar, las células tienen propiedades muy específicas (sólo el 0,1 % de las que salen a los vasos linfáticos o sanguíneos lo logran); por un lado, ser como “células madre”, que tengan la capacidad de dividirse indefinidamente, y por el otro, ser hábiles para establecerse y sobrevivir en un ambiente diferente al de su origen. No dependen de señales extracelulares para crecer y dividirse como pasa con las células normales. Solo son pocas las que logran colonizar y el tiempo en el que lo logran es indefinido, al igual que la causa por la cual se establecen en sitios muy diferentes a su tejido de origen. Al establecerse en algún tejido comienzan un proceso análogo al del tumor primario, es decir, pasan por las mismas etapas hasta lograr vascularizarse.

Esta etapa es peligrosa, pues el tumor es capaz de invadir no solo tejidos locales, sino también aquellos distantes, y si está vascularizado, esos nuevos vasos son una ruta de escape para las metástasis. Por eso es tan importante la inhibición de la angiogénesis para minimizar la diseminación.

### **Que es la angiogénesis?**

Es la formación de nuevos vasos sanguíneos partir de la vasculatura existente y al intento de inhibir este proceso se lo llama terapia anti-angiogénica. No sólo se observa en los tumores, sino también en la cicatrización de las heridas, en una inflamación tisular, en el ciclo menstrual, en la formación embrional y en algunas enfermedades como las retinopatías y las placas arterioescleróticas.

Las células endoteliales son fundamentales en este proceso al igual que la membrana basal y la matriz extracelular con fibroblastos y miocitos [6]. El endotelio reconstruye, repara y renueva los vasos, proliferando y migrando a los sitios dañados.

La angiogénesis comienza con la quimiotaxis (movimiento celular controlado por el gradiente de algún químico difusivo), que tienen las células endoteliales ante ciertas señales químicas, segregadas por células en estado de hipoxia; la falta de oxígeno en casi cualquier tipo de célula provoca un incremento intracelular de la contracción del factor

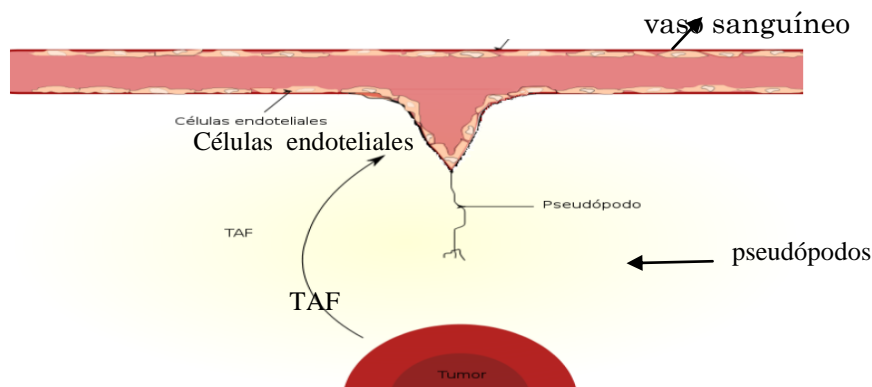
hipoxia-inducible (HIF-1), que estimula la secreción extracelular de proteínas [6], como por ejemplo, el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF).

En el tumor avascular latente, las células se hallan en hipoxia porque no llega suficiente oxígeno por difusión, y segregan factores de crecimiento, o factores o señales angiogénicas tumorales (TAF). Hay más de 30 factores, que se difunden en el tejido circundante actuando sobre las células endoteliales de los vasos más cercanos; ellas responden quimiotácticamente a esas proteínas, secretando enzimas que degradan la membrana basal del vaso capilar o vaso parental o progenitor.

Al ser degradada la membrana basal del vaso, quedan espacios que permiten el paso a pseudópodos (extensiones de la superficie de las células endoteliales) hacia la matriz extracelular. Estos guían la dirección en la que se va a desarrollar el nuevo vaso y poco a poco, la membrana basal permite el paso a células endoteliales completas, las que migran a la matriz extracelular formando columnas celulares o brotes que van a dar origen a la nueva vasculatura. (Fig. 4).

En un tejido normal, estos vasos crecen hasta alcanzar a otro vaso sanguíneo y así forman una red para el torrente sanguíneo; pero en el caso del cáncer, estos vasos llegarán hasta él, penetrándolo y proveyéndole su propio sistema circulatorio.

Según Folkman [5], es a una determinada distancia de la punta de los nuevos brotes donde las células endoteliales comienzan a proliferar; algunos de los brotes cercanos, al crecer, fusionan sus puntas formando lazos o bucles, durante un proceso conocido como anastomosis. (Fig. 5).



**Fig 4.** Pseudópodo. Extensiones de la superficie de las células endoteliales, las que guían la dirección en la que se va a desarrollar un nuevo vaso sanguíneo.

En estas anastomosis se vuelve a dar el proceso de angiogénesis, que induce nuevos vasos capilares. Estos derivan del vaso parental, sus estructuras suelen ser diferentes, pues tienen formas irregulares debido a la excesiva proliferación de las células endoteliales. A veces están incompletos, torcidos y tienen una circulación sanguínea lenta, lo que facilita la diseminación de las metástasis [9] y dificultan la llegada al tumor de ciertos químicos de las terapias antitumorales.

El tumor segrega antígenos, factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, que determinan si habrá o no angiogénesis. La progresión del tumor avascular al estado vascular se conoce como el “switch” del fenotipo angiogénico, pues cuando segrega más factores pro-angiogénicos, pasa del estado latente al vascular, y cuando segrega más anti-angiogénicos, permanece inactivo. [8].

La terapia anti-angiogénica pretende inhibir la vascularización del tumor, manteniendo la latencia, y, eventualmente, la necrosis total.

Esta es una terapia nueva, que Folkman propuso en 1971, y que recién en 2004, se



implementó en pacientes con cáncer colonorectal.

La tasa de mutación de las células cancerosas es muy alta y desarrollan resistencia a la mayoría de las terapias existentes, lo cual es uno de los principales obstáculos para curarlo por completo. A diferencia de ellas, el principal objetivo de la terapia anti-angiogénica son las células endoteliales, las cuales son genéticamente más estables, pocas veces se dividen y tienen una tasa baja de mutación.



**Fig 5.** Anastomosis de vasos capilares. Algunos de los brotes capilares que se forman, al crecer fusionan sus puntas formando "loops" o ciclos, durante un proceso conocido como anastomosis.

La terapia anti-angiogénica se dirige a las células endoteliales de 2 formas: indirecta y directa. Los inhibidores indirectos son aquellos que bloquean los receptores de los productos segregados por el tumor. Por ejemplo, algunos de ellos bloquean o neutralizan a los receptores de las células al VEGF.

Los inhibidores directos, son los que bloquean la proliferación y migración de las células endoteliales. Son de 3 tipos: 1): los sintéticos, diseñados para interferir en alguno de los pasos del proceso angiogénico (metaloproteinasas); 2): moléculas de bajo peso molecular (caplostatina) y 3): inhibidores endógenos o naturales, aquellos que son segregados por el tumor mismo o por las células que se encuentran a sus alrededores (endostatina y angiostatina).

Debido a la naturaleza del modelo matemático que se quiere estudiar, sólo nos concentraremos en los inhibidores directos endógenos.

Bouck fue el primero en demostrar que el cáncer produce inhibidores angiogénicos como la trombospondina. La angiostatina, es una proteína que detiene el crecimiento de los tumores primarios, pues inhibe la proliferación y la migración de las células endoteliales de una forma dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración mayor inhibición. Promueve que los tumores regresen a su estado de latencia por el balance entre las células apoptóticas y las proliferantes, aumentando la apoptosis sin que se modifique el índice de proliferación.

Un proceso muy peculiar en el que participa la angiostatina, es el de la paradoja del tumor primario. Este fenómeno fue descrito en los tumores de mama, de colon y en los sarcomas osteogénicos, en los cuales extirpando el tumor, después de un tiempo (meses o años), se inicia un crecimiento exponencial de las micro-metástasis presentes en el organismo, pero ocultas por su tamaño al momento de remover el tumor primario.

Por ello, se desarrollaron estudios para demostrar que el tumor primario en el organismo era el que detenía el crecimiento de los tumores secundarios o micro metástasis.



Así, Folkman y sus colaboradores, en un modelo murino del carcinoma pulmonar de Lewis, implantaron sus células por vía subcutánea en el dorso como tumor primario en 2 grupos de ratones. Después de unos días, al primer grupo se le extirpó el tumor primario y observaron una vascularización total en las metástasis que hace este carcinoma en el pulmón.

Al segundo grupo, en el cual no se le extirpó el carcinoma de Lewis, encontraron que sus metástasis no presentaban vascularización. Fue así que al hacer el análisis del suero de los ratones de este grupo pudieron aislar, por primera vez, a la angiostatina, que se encontraba en altas concentraciones.

Para demostrar que la presencia del tumor primario inhibía directamente la angiogénesis, Folkman implantó en la córnea del ojo de ratones un polímero biocompatible (desarrollado por Langer y Folkman), el que liberaba constantemente factores angiogénicos, simulando la actividad de un tumor. Tiempo después, la vascularización alrededor de este material fue evidente.

A otros ratones se les administraron inyecciones subcutáneas de angiostatina humana después de 48 horas, y se observó que a diferencia de los anteriores, en este grupo se podría valorar una notable inhibición de la angiogénesis.

Con este experimento concluyeron que el efecto inhibitorio de la angiogénesis de las metástasis está directamente relacionado a la presencia del tumor primario en el organismo.

La inhibición indirecta de las metástasis tiene lugar porque mientras el tumor primario estimula su propia vascularización también segrega los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos; como ambos son secretados a la circulación, permanecen en el torrente sanguíneo durante su vida media, siendo la del VEGF de 3 minutos y la de la angiostatina de 2,5 días, y al alcanzar esta última a los tumores secundarios, inhibe su proceso de angiogénesis. Para que este efecto inhibitorio exista, el tumor primario debe poseer un tamaño umbral, ya que éste se correlaciona con la potencia angiogénica que tenga sobre los secundarios, es decir, mientras más grande es el tumor más angiostatina segrega, y por lo tanto, la angiogénesis de las metástasis se inhibe más.

La angiostatina no sólo inhibe la neo-vascularización de las metástasis, sino también hace que éstas permanezcan en estado de latencia. Debido a su alto potencial anti-angiogénico, se incorporó a la terapia anti-angiogénica, después de haber extraído el tumor, para simular la presencia del mismo, y así detener el crecimiento exponencial de los secundarios. La endostatina es otro potente inhibidor natural de la angiogénesis, y como la angiostatina, es un inhibidor específico de la proliferación de las células endoteliales y fue descubierto por Folkman de la misma forma que la angiostatina. Se observó que, al ser suministrada en ratones con carcinoma pulmonar de Lewis, la endostatina inhibía el crecimiento de las metástasis, manteniéndolas en estado microscópico, así como el crecimiento del tumor primario regresándolo a un tamaño de menos de 1 mm<sup>3</sup>. Fue usada en el tratamiento de los tumores malignos humanos, tales como melanomas, fibrosarcomas y hemangio-endoteliomas, implantados en ratones. Estas observaciones sugirieron a Folkman, que una de las posibles formas y quizás exitosa para atacar al cáncer era viéndolo en términos de 2 distintas poblaciones celulares: las cancerosas y las endoteliales.

Hoy en día, la terapia anti-angiogénica es utilizada para erradicar el cáncer humano, pero es importante señalar que, en muchos casos no es suficiente, y tiene que ser complementada con quimioterapia y radioterapia.

### **Breve reseña histórica de la Inmunidad Anti-Tumoral (IAT).**

A principios del siglo XX, Loeb, Jensen y Erlich, iniciaron una serie de experimentos, trasplantando tumores en animales de laboratorio. Observaron que los animales sanaban espontáneamente del tumor trasplantado, y que resistían la incorporación de un inóculo posterior de dichas células tumorales. Se interpretó que el animal se había inmunizado contra el tumor por la presencia de antígenos específicos presentes en sus células. Ese optimismo decayó dado que si bien un animal puede hacerse inmune contra un tumor trasplantado, no era porque se detectaban antígenos específicos, sino porque se reconocían antígenos de histocompatibilidad del animal donante del tumor que eran distintos de los

propios. Luego, Main y Prehn, en 1957, publicaron un trabajo donde utilizaban cepas endocriadas de ratones (son ratones estandarizados con características genéticas y sanitarias definidas, y con el correcto cumplimiento de los principios éticos y de bienestar animal), y fibrosarcomas inducidos por metil-colantreno, un hidrocarburo aromático policíclico (agente carcinogénico), con fórmula  $C_{21}H_{16}$ , que es una sustancia de color amarillo que se cristaliza del benceno y del éter. Se vio que a los ratones que les habían implantado y luego extirpado un tumor eran capaces de resistir implantes posteriores de células del mismo tumor. Lo contrario ocurría cuando se inoculaban células de un tumor distinto, que crecían sin oposición. Los resultados demostraron que la respuesta inmune desarrollada contra estos tumores estaba dirigida contra antígenos presentes en las células tumorales, que no solo diferían de los antígenos normales, sino de los presentes en otro tumor inducido por el mismo carcinógeno químico.

Klein años más tarde, demostró que el pre-tratamiento con células tumorales muertas por radiación, inmunizaba contra el fibrosarcoma inducido por el metil-colantreno con la misma eficiencia que lo hacía la implantación y extirpación del tumor. Ambos métodos son considerados los 2 procedimientos clásicos de vacunación contra los tumores.

A partir de allí, se llevaron a cabo gran cantidad de experimentos en ratas, ratones, y hámsters, con sustancias químicas como la nitrosamina, el dimetil-benzatraceno, y el metil-colantreno, por métodos físicos como los rayos X, los ultravioletas y agentes virales, como los herpes y los retrovirus. Se formularon diversas teorías y se fue construyendo la base de la IAT. Los ratones que eran inmunizados contra un tumor, podían transferir esa inmunidad por los LT, pero no por los anticuerpos; esto es así para los tumores del ratón, salvo en las leucemias donde los anticuerpos cumplen una función antineoplásica.

En segundo lugar, se realizaron ensayos in vitro destinados a determinar la antigenicidad de los tumores en cultivos, y por último, Thomas y Burnet editaron su teoría de la inmunovigilancia (“surveillance”) en 1957.

Esta sostiene que el sistema inmune, con sus LT, protege y patrulla el organismo en la búsqueda de las células tumorales para eliminarlas antes de que se manifiesten como tumores clínicos, además de proteger contra los patógenos externos como los virus, las bacterias, los hongos y los parásitos. Esta teoría funcionó bien en ratones y en pacientes inmunodeficientes, que sufrían un número mayor de tumores que los normales; por ende, los que aparecían en un sistema inmune normal deberían ser el producto de una falla específica del sistema de vigilancia.

En 1976, Hewitt, empleó tumores de origen espontáneo, a diferencia de los que usaban tumores inducidos por dosis masivas de agentes químicos o biológicos. Observó que estos tumores no presentaban inmunogenicidad detectable, en contraposición a los anteriores.

En 1981, Middle y Embleton, llegaron a la misma conclusión que Hewitt, con los tumores espontáneos de rata. Estos hechos marcaron el fracaso de la formulación de la teoría anterior, si bien, los pacientes y animales inmuno-deficientes mostraban una mayor proporción de tumores, éstos eran derivados del sistema linforeticular, pero no eran los más comunes, como los del pulmón, la mama, etc.

Si la teoría de la inmunovigilancia hubiera sido el mecanismo universal antitumoral propuesto todos esos tumores deberían haber aumentado su frecuencia en individuos inmuno-suprimidos. Otro hecho fue la comprobación de que los ratones nude, genéticamente timo-privos no mostraban una mayor frecuencia de tumores espontáneos que los ratones convencionales, lo que demostraba que la vigilancia inmunológica no estaba mediada por los LT, como se había postulado. Así, la IAT entró en descrédito que perduró desde 1980 hasta la década siguiente. En los 90, se reactivó la IAT, debido al conocimiento de los pasos moleculares del reconocimiento antigénico y de la activación de la respuesta inmune celular a través de cascadas enzimáticas y producción de citoquinas pro-inflamatorias. La importancia de la célula dendrítica (CD) como célula presentadora de antígenos, amplió el concepto de vigilancia inmunológica más allá de considerar a los LT y a las NKC. Los ratones knock-out para diferentes componentes del sistema inmune, permitieron reconsiderar ciertos aspectos de la teoría de Thomas y Burnet, ya que ratones

privados de uno u otro componente de la respuesta inmune, evidenciaba la aparición de tumores que no se restringía sólo a los hematopoyéticos. Ello reavivó la posibilidad de que el cáncer pudiera ser abordado, también, por medio de terapias inmunológicas.

**Como se evidencia el sistema inmune en la defensa frente a los tumores:**

La historia natural de un tumor incluye la fase de crecimiento in situ, invasión, extravasación y metástasis. Durante esas fases, las células tumorales interactúan con su microambiente tolerogénico, endotelio vascular y con el sistema inmune.

Los estudios histopatológicos, demuestran que los tumores están rodeados por infiltrados linfoides, y por diferentes tipos de células, como los macrófagos (M), LB y LT, NKT, NKC y mastocitos. Se ha asociado a estos últimos con factores de la inflamación crónica y la progresión tumoral, mientras que el infiltrado de sub-poblaciones de LB y LT, células NKT, NKC y CD se relaciona con el control de la enfermedad, y mejor pronóstico en el melanoma, la mama, el ovario, el linfoma no Hodgkin, el de cuello uterino, el carcinoma urinario y el de colon, al igual que el hallazgo de LT proliferando en los ganglios linfáticos drenantes.

Las recaídas luego de 15 a 20 años del tratamiento inicial, demuestra que hasta entonces la IAT había sido capaz de bloquear el crecimiento tumoral.

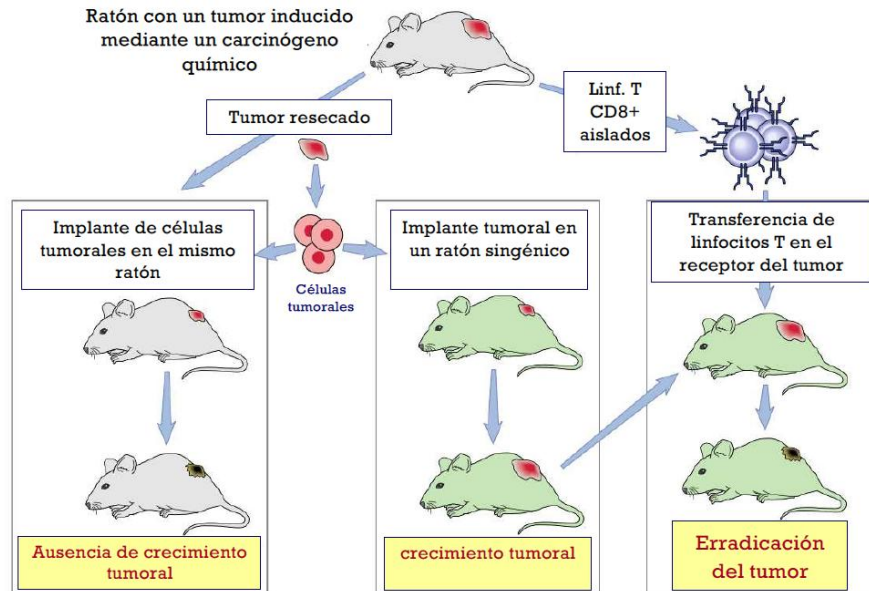
Hay remisiones de tumores malignos comprobadas histológicamente, como la regresión espontánea, la regresión después de remover el primario, y la regresión post-quimioterapia.

Con antelación se citó la respuesta protectora en ratones pintados con metil-colantreno (MCA), así como, la no-respuesta al inocular a ratones singeneicos. El LT procedente del ratón portador del tumor pueden transferir la IAT frente al tumor a otro animal sin neoplasia. Así, tienen las propiedades que definen a la RIA, de especificidad y memoria. La inoculación del suero de un ratón que se ha recuperado de un tumor, inhibe el crecimiento del mismo tumor en otros ratones. (Fig 5.)

Se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que determinan las RIC y RIA, por lo que los modelos experimentales se han ido perfeccionando, y no cabe duda de la importancia del sistema inmune en la IAT.

La teoría de la inmuno-vigilancia ya no es suficiente para describir las relaciones entre el sistema inmune (SI) y el tumor. Se pensó que la inmuno-vigilancia cumplía una función de protección hacia el organismo, a través del sistema adaptativo, en las etapas, muy tempranas del cáncer. Se sabe hoy que tanto la inmunidad connatural (RIC) como la inmunidad adaptativa (RIA) participan en el proceso y protegen al hospedador contra el desarrollo de tumores y su inmunogenicidad, por lo que, se propuso una denominación más abarcativa o “inmuno-edición” del cáncer para marcar este papel doble de la inmunidad, en el rearrreglo de la enfermedad neoplásica y además en la prevención.

La “inmuno-edición” del cáncer representa la ampliación de la hipótesis original de la inmuno-vigilancia. La “inmuno-edición” contempla las 3 etapas del tumor, como Dun lo describió en 2004, llamando “Las Tres E” de la “inmuno-edición”: **Eliminación, Equilibrio y Escape.**



**Fig 5.:** Los ratones curados quirúrgicamente de un tumor provocado por MCA rechazan trasplantes posteriores del mismo tumor, el tumor trasplantado crece en otro ratón singéneo. También rechazan el tumor los ratones en que se realiza una transferencia adoptiva de LT procedentes del animal en que se desarrolló originalmente el tumor.

**Eliminación:** en esta etapa se representa el concepto original de la inmuno-vigilancia (**Fig.6 A y Fig.7**), aquí el SI reconoce y erradica las células tumorales originadas, representa al proceso de inmuno-edición sin llegar a la progresión y las fases subsiguientes.

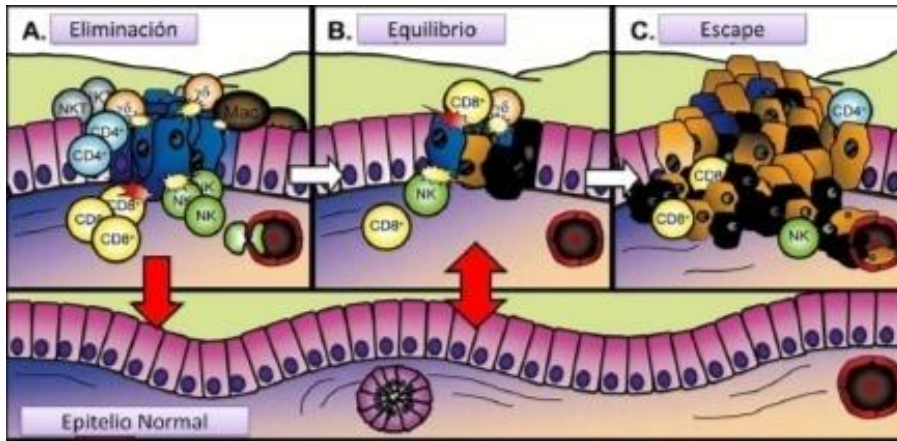
El rechazo inmunológico de un tumor en desarrollo, como la defensa contra un microorganismo, requiere de un acto integral, que participen del mismo, la RIC y la RIA.

El primer paso de una respuesta IAT (**Fig. 6 A**) ocurre cuando las células de la RIC se activan por la presencia de un tumor en desarrollo, debido a los cambios del tejido local. Durante el proceso de angiogénesis e invasión produce moléculas pro-inflamatorias que, junto con las citoquinas generadas por las células tumorales convocan a las células del SI mediante las señales de daño local. Las células de la RIC, reclutadas por la masa tumoral, o células NKT, NKC y M reconocen ciertas moléculas en el tumor inducidas por la inflamación o por los procesos de transformación celular.

Luego, (**Fig. 7 B**), los productos generados por los M que han infiltrado el tumor, con bajas cantidades de IL-12, estimulan a las NKC, del mismo infiltrado y que liberan bajas cantidades de  $\text{INF-}\gamma$ , que a su vez activan a los M a producir más IL-12, lo que aumenta la producción de  $\text{INF-}\gamma$  generado por las NKC.

Este sistema autocrino por retroalimentación activa una serie de mecanismos dependientes del  $\text{INF-}\gamma$ , tales como efectos anti-proliferativos, pro-apoptóticos y anti-angiogénicos, que tienden a eliminar parte de la masa tumoral.

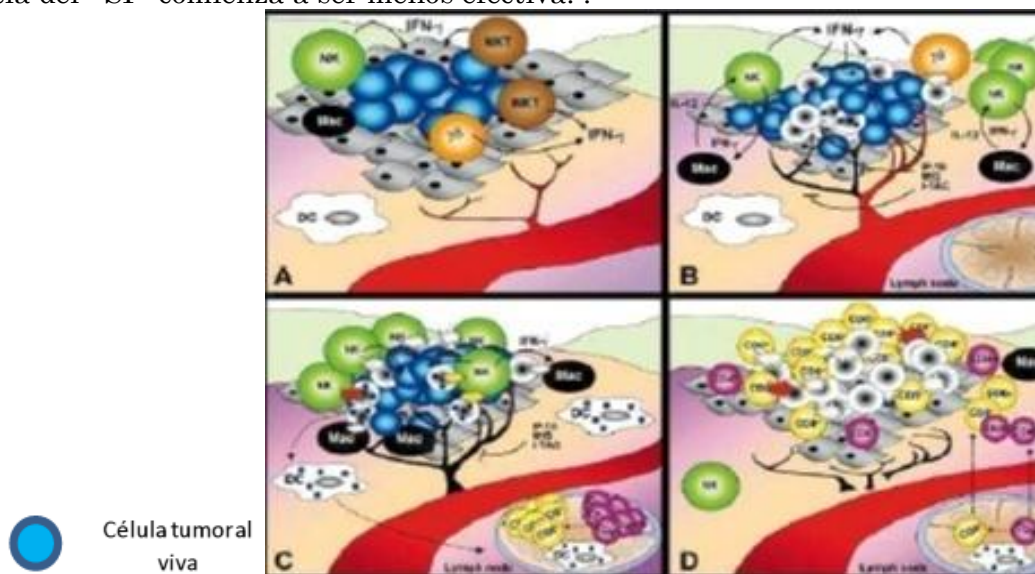
Así, se generan células tumorales muertas, liberando una fuente de antígenos disponible para ser procesada por el SI.



**Fig 6:** Las tres E de la inmuno-edición del cáncer: eliminación, equilibrio y escape. Las flechas rojas indican que tanto en la fase de eliminación como de equilibrio el SI puede eliminar el tumor, retornando al epitelio normal.

Luego, (**Fig.7 C**), los antígenos liberados del tumor por los efectos de la RIC genera una RIA específica. En el 3º paso se reclutan CD y CDi (células dendríticas inmaduras) en el tumor y se activan por citoquinas o por las NKC que han infiltrado el mismo. Las CD endocitan los antígenos de las células muertas o por los complejos de HSP-antígenos tumorales (proteínas del estrés térmico), y luego las CDs migran hacia el ganglio drenantes, donde activan a los LTCD4-Th1 y LTCD8. En el último paso (**Fig.7 D**) los LTCD4 y LTCD8 se dirigen al tumor para su destrucción.

La eliminación es un proceso que se repite a medida que aparecen antígenos tumorales distintos, por eso el cáncer aparece con más frecuencia en la ancianidad donde la inmunovigilancia del SI comienza a ser menos efectiva. .



**Fig 7:** Modelo propuesto para la fase de eliminación de la hipótesis de la inmuno-edición. Los eventos de la figuras son descritos en el texto. CD: células dendríticas, M: macrófagos, NKC: natural killer, NKT: natural killer-tipo LT.

**Equilibrio:** en esta fase (**Fig. 6 B**), las células tumorales que han sobrevivido entran en un equilibrio dinámico con el SI. Esta fase es la más larga y puede durar años. El SI podría seleccionar y/o promover variantes de células tumorales que sobrevivan al control inmunológico.

**Escape:** en ésta fase ( **Fig.6**), el tumor, por mecanismos de resistencia evade al SI, evitando que lo destruyan. La progresión desde el equilibrio hasta el escape se debe a cambios por mutaciones genéticas celulares. Por la selección Darwiniana, las células tumorales son capaces de crecer progresivamente. Al saber como los tumores escapan a la detección del SI, será posible desarrollar métodos y diseñar estrategias para que el SI ataque al tumor.

### **Las células inflamatorias. Citoquinas, quimioquinas y moléculas en la IAT.**

La función esencial del SI es proteger al organismo, ya sea de agentes infecciosos del ambiente, como de vigilar el crecimiento descontrolado de las células propias, que proliferan siguiendo un programa genético regulado por estímulos extracelulares, que al alterarse podría ser la base genética del cáncer con una acumulación de mutaciones celulares.

Este crecimiento progresivo incontrolado y autónomo, no obedece a las leyes que controlan la multiplicidad celular de un organismo, se caracteriza por la mono-clonalidad, la anaplasia, la autonomía y la agresividad.

Ante estas situaciones extrañas el organismo se defiende de 2 formas:

1): defensa inespecífica o RIC, donde las células tumorales son lisadas por las células epiteliales, CD<sub>s</sub>, M, neutrófilos, NKC, NKT, moléculas del sistema complemento y citoquinas. Las células están equipadas con receptores de reconocimiento de patrones PRR que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos PAMP y señales endógenas asociadas a daño tisular DAMP. La RIC es capaz de activarse únicamente frente a estas señales de peligro detectadas por los PRR, que son las primeras barreras defensivas y no generan memoria inmunológica, formando parte de ésta barrera, la piel, las mucosas y las funciones anti-microbianas de los tejidos. Las NKC son las células de la RIC más relacionadas con la respuesta anti-tumoral, ya que demostraron la capacidad de erradicar tumores.

2) : la segunda defensa específica o RIA, mediada por componentes celulares (LT, LB) y humorales (anticuerpos), genera respuestas antígeno-específicas, y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno (Ag). Las células presentadoras de Ag (CPA), y en especial las CD y los M, son la conexión entre la RIC y la RIA, ya que son las responsables de procesar y presentar Ag a los LT en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) presentes en su superficie.

En consecuencia, la RIC tiene como segunda función estimular y polarizar la respuesta RIA con el objeto de optimizar la eliminación de la célula tumoral. El SI está compuesto por gran variedad de células funcionalmente distintas que derivan de células hematopoyéticas que se renuevan a si mismas y dan lugar a células progenitoras mieloides (CPM) y linfoides (CPL), y que dan origen a granulocitos, M, CD y mastocitos, LB, LT, NKC, y NKT.

De la interrelación entre las células inflamatorias, las citoquinas y las quimioquinas surge un hecho clave que define el destino del tumor. El reclutamiento de los leucocitos en el sitio del tumor es consecuencia de un balance entre la IAT que desarrolla el huésped y los mediadores inflamatorios que pueden inducir y facilitar la invasión del tumor primario.

Las células involucradas en el rechazo tumoral directamente son las LTCD8<sup>+</sup> específicas, NKC, NKT, y en menor proporción LB→plasmocitos productores de anticuerpos específicos y M citotóxicos. En algunos tumores conjuntamente con las células mediadoras y efectoras de la IAT, se observan M y polimorfonucleares que son características de la inflamación existente. La necrosis libera factores pro-inflamatorios y activadores de la coagulación, con liberación del tromboxano A<sub>2</sub>, de la IL-8 y de la actividad como quimio-attractante del complemento. Se generan citoquinas, y se produce la angiogénesis que contribuye a la reparación del daño. Así, se establece el tumor, su velocidad de crecimiento, su necrosis y daño celular junto con la reparación del tejido dañado. La fibrosis y la angiogénesis, son señales para las células inflamatorias, factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, que son favorecidas por la célula tumoral, por producir también citoquinas quimio-attractantes, de bajo peso molecular, que regulan la respuesta de los leucocitos.

### **Las células inflamatorias presentes en los tumores.**



**Neutrófilos:** los poli-morfonucleares (PMN), son [leucocitos](#) del tipo granulocito. Miden de 9 a 12  $\mu\text{m}$  y es el más abundante de la [sangre](#) del [ser humano](#), representando el 60-70 % de los mismos. Al igual que los M/monocitos y LT activados, desarrollan el fenómeno del “rolling” o rodamiento o desplazamiento sobre el endotelio vascular para migrar así, desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de la inflamación/infección, por medio de la unión entre las moléculas de adhesión presentes en sus membranas y las del endotelio de las vénulas post-capilares. Citoquinas como, la IL-1 y el TNF, y las quimioquinas de la matriz extracelular (fibrina y fibronectina) que promueven la expresión de la selectina E, se unen con baja afinidad a los hidratos de carbono de las vellosidades de la membrana plasmática del PMN. Se expresan ligandos para las integrinas, como la VCAM-1, la VLA-4, la LFA-1 y el Mac-1. Esa baja afinidad que posibilitaba la unión y la desunión facilitando así el “rolling” leucocitario, se transforma en una alta afinidad, obligando así al PMN a permanecer cerca del foco inflamatorio, y no ser llevado por el torrente circulatorio, lo que implica una adhesión estable con un cito-esqueleto organizado, que es el preludio de su migración trans-endotelial siguiendo un gradiente de concentración química tisular que no se hallaba en la circulación.

Así, tanto el PMN como el monocito-M se acumulan rápidamente alrededor de los patógenos y tienden a erradicar la infección. El sistema mononuclear fagocítico deriva de la célula totipotencial de la médula ósea que se diferencia en monoblasto, monocito sanguíneo, y por fin, en M tisular, con estratégicas localizaciones por las que fue rebautizado como células de Küpffer en el hígado, osteoclasto en el hueso, microglia en el sistema nervioso central y M alveolar en el pulmón. Miden unos 15  $\mu$  y exhiben un núcleo en forma de C o arriñonado, no poli-lobulado como el PMN o eosinófilo. Posee lisosomas, vacuolas fagocíticas (fago-lisosomas) y filamentos cito-esqueléticos. Gracias a ellos, el ingreso de un microorganismo es incorporado a una vesícula como prerrequisito para su destrucción.

Los PMN y los M expresan en sus membranas una serie de receptores que se unen al patógeno y facilitan su ingreso a la intimidad celular; también activan a las células a producir citoquinas y péptidos microbicidas. El cito-esqueleto del fagocito despliega un papel importante en rodear al patógeno con 2 brazos membranosos para facilitar su ingreso al mismo, componiendo así la vesícula o fagosoma, que luego se separa de la membrana plasmática y permanece en el interior del citoplasma. A ese fagosoma se le une un lisosoma y componen el fago-lisosoma donde se despliegan los mecanismos microbicidas. Los fagocitos convierten el oxígeno molecular en intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) y dan origen así a un proceso que se ha bautizado como el “estallido respiratorio”. El principal generador de radicales libres es el sistema de la oxidasa del fagocito, que, con sus numerosas subunidades se ensambla en el fago-lisosoma, reduce al oxígeno molecular en IRO, como los radicales de super-óxido, de manera tal que la forma reducida del NADPH (fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido) actúe como cofactor. El super-óxido se dismuta enzimáticamente en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que emplea a la mieloperoxidasa en la conversión de los iones haluro no reactivos en ácido hipohaloso reactivo, y muy tóxico para las bacterias. Además de los IRO, los M producen intermediarios activos del nitrógeno (óxido nítrico) por la actividad de una enzima, la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS), que no se halla en el citosol del M en reposo sino cuando éste está activado por lipo-polisacáridos, y por el INF- $\gamma$ . La iNOS convierte a la citrulina en arginina liberando gas de óxido nítrico muy difusible. En los fago-lisosomas, el óxido nítrico se puede combinar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o super-óxido, producidos por la oxidasa del fagocito, e inducir radicales de peroxi-nitrito muy tóxicos para los patógenos. Otra enzima proteolítica, muy importante para eliminar microorganismos, presente tanto en los PMN como en los M es la elastasa. Estas sustancias tan eficaces en la destrucción de patógenos, pueden lesionar a los tejidos normales del huésped si llegan al ambiente extracelular, generando más respuesta inflamatoria y daño tisular. La liberación de los PMN desde los vasos sanguíneos está condicionada por la liberación de [histamina](#) (liberada por [mastocitos](#)) y [TNF- \$\alpha\$](#)  (liberado por M). El TNF- $\alpha$  y la histamina actúan sobre las células del [endotelio](#) del vaso, haciendo que se active mediante la expresión de la [selectina-E](#). Los

PMN activados mediante la IL-8 se unen a la selectina-E mediante su ligando glucídico. Así, están presentes en los tejidos en 5 horas después de empezar la infección. Los PMN relacionados con el crecimiento y propagación del cáncer.

Se demostró que aquellos funcionan como "primera respuesta" en la inflamación aguda, promueven el crecimiento de los vasos sanguíneos en los tejidos normales y sanos, y también lo hacen en los tumores malignos y en la propagación de las células tumorales por los vasos de neo-formación. La evidencia señala que los PMN desempeñan un papel importante durante las primeras etapas del desarrollo del tumor, y serían *una de las primeras células inflamatorias en la escena*. Se resalta la capacidad angiogénica y la actividad de la metalo-proteínasa-9 o MMP-9. Las metalo-proteinasas son endo-peptidasas con una función degradativa contra la matriz extracelular (MEC). Todas las metalo-proteinasas contienen un péptido señal, un pro-péptido y un dominio catalítico amino-terminal que contiene el sitio fijador del zinc.

En la piel, se evidencia un aumento de la producción de metalo-proteinasas en la reparación de las heridas, en el envejecimiento cutáneo, en las enfermedades ampollares, en la fibrosis dérmica y en la invasión tumoral. Los PMN poseen mayores cantidades de MMP-9 pre-sintetizada que los demás leucocitos, lo cual establece su vínculo con el crecimiento y propagación del tumor.

Experimentos en embriones de pollos y ratones, demostraron que la MMP-9, con o sin inhibidores, estaba relacionada con la angiogénesis tumoral. Trataron de bloquear la formación de nuevos vasos con un anti-inflamatorio como el ibuprofeno, pero sólo se logró reducir la angiogénesis con la MMP-9. La neutralización de la IL-8, también reduce la afluencia de PMN, por ende, la no-formación de los vasos, reduciendo y limitando la propagación de las células cancerosas a otras áreas del cuerpo.

Se concluye que, al actuar sobre los PMN, se reduce la agresividad del tumor, y que, la MMP-9, juega un papel fundamental en su desarrollo.

Al utilizar cultivos celulares y modelos de cáncer en ratones se observó que existía una relación entre una infección, la inflamación y las metástasis. Una red de "trampas extracelulares" (NETs) es producida por los PMN en respuesta a una infección, para matar a los patógenos. En los animales con cáncer, la red de PMN (NETs), también atrapa a las células cancerosas, pero en lugar de matarlas, las activan y las hacen más propensas a desarrollar metástasis. Sería útil romper la red de PMN mediante el uso de medicamentos. Los NETs son filamentos extracelulares de cromatina nuclear asociados a proteínas citoplasmáticas granulares, liberadas por los PMN activados. Los NETs son capaces de :

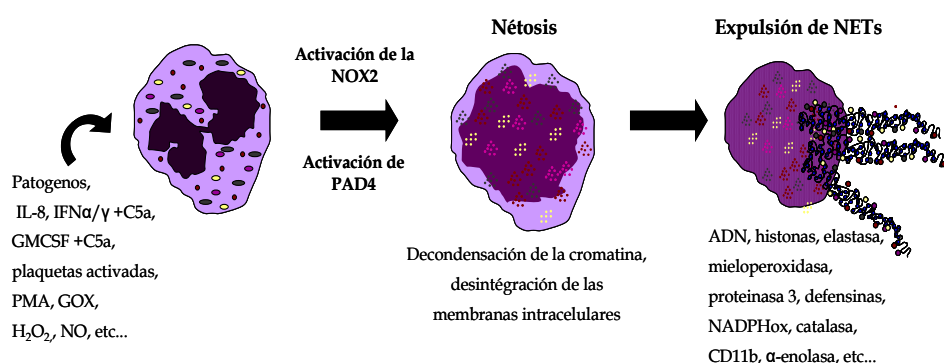
- 1) : inducir la maduración fenotípica de las CD<sub>s</sub>;
- 2): determinar el perfil madurativo de las CD<sub>s</sub> y regular la producción de sus citoquinas, estimuladas o no, por agonistas convencionales y agentes sensibilizantes de contacto;
- 3): inducir la capacidad de las CD<sub>s</sub> de orientar el perfil de diferenciación de los LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup> en diferentes perfiles efectores, y
- 4): caracterizar las vías de señalización activadas en CD<sub>s</sub> estimuladas por los NETs.

Los PMN se purifican a partir de sangre de voluntarios por métodos convencionales. Las CD<sub>s</sub> se obtienen de monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 por 7 días. Los NETs se aíslan por digestión con enzimas de restricción y se caracterizan por proteómica. Descritos en 2004, se forman por un proceso de muerte celular denominado netosis. En ella, la cromatina se descondensa luego de la deiminación de los residuos de arginina de las histonas y su transformación en citrulina no cargada, gracias a la PAD-4 (peptidil-arginina-deaminasa). Luego, se desintegra la membrana nuclear y las organelas intracelulares permiten a la cromatina fijar proteínas citoplasmáticas o granulares, enzimas y moléculas microbicidas. La etapa final de la netosis es la expulsión extracelular de esta cromatina recubierta de proteínas, definiendo a los NETs, como la etapa final de



una muerte celular diferente de la necrosis y de la apoptosis.

No depende de la activación de las caspasas y no implica la fragmentación del ADN ni la exposición de fosfatidil-serinas en la superficie celular. No sólo se observa en los PMN, pues se describió en los eosinófilos y en los mastocitos.



**Fig. 8:** Pasos moleculares de la netosis en los PMN.

La estructura central de los NETs se compone del ADN asociado a las histonas. Ésta estructura es destruida por un tratamiento con la desoxirribonucleasa (ADNasa), pero queda intacta frente a la acción de las proteasas. En la actualidad, numerosas proteínas han sido identificadas asociadas a la superficie de los NETs, que son enumeradas en la Tabla 1, donde se las clasifica según su origen o función.

Origen/Función	Proteínas	Origen/Función	Proteínas
Núcleo	<i>Histonas: H2A, H2B, H3 et H4</i> <i>MNDA</i> <i>HMGB1</i>	Gránulos	<i>Elastasa</i> <i>Lactoferrina</i> <i>Azurocidina</i> <i>Catepsina G</i> <i>MPO</i> <i>PR3</i> <i>Lisozima C</i> <i>Defensina 1 y 3</i> <i>Gelatinasa</i> <i>LL-37</i> <i>BPI</i>
Citoplasma	<i>S100 calcium-binding protein A8, A9 et A12</i>		
Membrana	<i>β2-integrina CD11b</i>		
Citoesqueleto	<i>Actina β y γ</i> <i>Miosina-9</i> <i>α-actina 1 y 4</i> <i>Plastina-2</i> <i>Citokeratina-10</i>		
Enzimas glicolíticas	<i>α-énolasa</i> <i>Trasquelotasa</i>		
		Peroxisomal	<i>Catalasa</i>

**Tabla 1.** Componentes de los NETs identificados.

La extrusión de los NETs expone a una alta concentración local de proteínas anti-microbianas. Empleando la línea celular mieloide humana PLB-985 diferenciada a PMN, se demostró que la *Escherichia coli* entérica (DAEC Afa / Dr) activa la producción de NETs que median, a través de sus proteasas, la pérdida de la integridad del epitelio intestinal, demostrado en el modelo celular Caco2-T. Las histonas liberadas son tóxicas para el ambiente celular y su toxicidad se ve disminuida por el activador de la proteína C, una molécula utilizada en el tratamiento de la sepsis grave. Numerosos estímulos pro-inflamatorios activan la netosis: bacterias, hongos, parásitos, lipo-polisacáridos (LPS), el

ácido forbol-mirístico (PMA), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), los donantes de óxido nítrico (NO), las plaquetas activadas, la IL-8, el GM-CSF o el componente C5a después de una pre-activación por el IFN-γ. La integridad de la NADPH-oxidasa (NOX2) es necesaria, pues los PMN deficientes en uno de sus componentes no producen NETs, como es el caso de los niños con Enfermedad Granulomatosa Crónica, o bien la línea celular PLB-985 gp91phox<sup>-/-</sup>.

Durante la netosis, numerosos componentes intracelulares se liberan al medio extracelular, lo que sugiere que no sólo tendría una acción microbicida, sino también inmunomodulatoria. Es interesante pensar en la posibilidad de que los propios NETs representen señales de alarma para el sistema inmune y pudiesen ser reconocidos como DAMPs (*danger-associated molecular patterns*). En la autoinmunidad, los NETs jugarían un papel en la etiopatogenia de la vasculitis con anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), en la nefritis lúpica, y en la artritis reumatoide inducida por exposición de auto-antígenos citrulinados. Es probable que los NETs puedan interactuar con las células presentes en los sitios de inflamación, en particular con las CD. Las pacientes con cáncer de mama que poseen un alto número de PMN, tienen mayor riesgo de desarrollar metástasis. Si las células del sistema inmunitario deben proteger nuestro cuerpo, no se entiende porqué los altos niveles de PMN se relacionan con una peor evolución.

El tumor envía moléculas que actúan como «señalizadores» que hacen que el SI produzca un gran número de PMN, que se comportan distinto y bloquean a los LT. La interleuquina-17 (IL-17) es crucial para el aumento de la producción y cambio de conducta de los PMN. La inhibición de la IL-17 por medicamentos, sería una estrategia segura, para tratar la psoriasis, el reumatismo y las metástasis.

Investigadores que han revisado más de 440 artículos científicos de la investigación oncológica, llegaron a la conclusión que debería cambiarse el paradigma imperante pues el control del crecimiento tumoral lo haría el RIC, y no el RIA (linfocitos e inmunoglobinas). El crecimiento de los tumores sólidos (la gran mayoría de los tipos de cáncer, a excepción de las leucemias y los linfomas), según un modelo matemático y su meta-análisis, señala que si la inflamación, es aguda, puede ser quien controle el crecimiento de estos tumores hasta llegar incluso a su eliminación, no así si la inflamación es crónica.

### **Los mastocitos (MC) :**

Son células conectivas receptoras/secretoras de monoaminas y fueron sospechadas como “paraneuronas” (Fujita, 1977 y Kitamura 1979). Se asocian con las fibras nerviosas en los tejidos normales y con las células de Schwann. En los urodeles (*Triturus pyrrhogaster*) poseen dendritas, que son abundantes en el sistema nervioso central humano cerca de los capilares, las meninges y los ventrículos, donde se detectan ambos tipos de MC (Tc y MTc) con gránulos unidos a los sacos membranosos del Golgi. Se acepta su origen mesenquimático a partir de la célula stem o hemocitoblasto o célula reticular primitiva (CD34+) siendo su factor de crecimiento (SCF) o factor stem-cell producido por fibroblastos y células endoteliales. El kit-ligando o factor steel es el receptor para el SCF y es una tirosina-kinasa c-kit (CD117) que lo expresa durante toda su vida a diferencia del basófilo que lo pierde al diferenciarse. La circulación y acumulación de MC depende de su interacción con el endotelio por moléculas de adhesión (integrina α4β7, la adhesina-Mad-CAM-1, la VCAM-1 y receptores de la familia del super-gene de las inmunoglobulinas). La serotonina es quimiotáctica para los MC lo que aconseja el empleo de fármacos antiserotonínicos (ciproheptadina). Nobleza obliga citar los trabajos pioneros de la década de 1970 de Pedro A. Colombi (1909/1975) y Angel Alonso, con difenilhidramina, ciproheptadina, el maleato de methyl-piperidylidene-thioxantene (HS592) y el “antamínico” clemastine (BP400) como inhibidores de la histamina, la serotonina, la bradiquinina y la SRS-A (sustancia de reacción lenta) o leucotrienos. Está demostrada la

acción de la IL-3, el RANTES, la MCP-1, las C-X-C, el PF-4, la laminina, la vitronectina y la fibronectina sobre los MC. Participan en la RIC pues pueden fagocitar bacterias (*Salmonella typhi*) estimulados por el LPS a través de los receptores Toll, activan el complemento por la vía alterna, e incorporan virus y parásitos, que quedan a merced de sus proteasas, prostanoïdes, citoquinas y catelicidinas líticas para Gram-positivos y negativos. También deterioran toxinas de los venenos de Hymenópteros y de ofidios. Activan la síntesis del colágeno y contribuyen a la tolerancia de los aloinjertos. Son muy sensibles al NGF (nerve growth factor) que es importante en el estrés humano. El nivel sérico del NGF está aumentado en la queratoconjuntivitis vernal, en el asma bronquial y en la urticaria aguda. Se correlaciona con el infiltrado celular de MC, eosinófilos y linfocitos, y, también con alteraciones psicológicas como la ansiedad, la agresividad, el alcoholismo y la abstinencia a drogas. El NGF desgranula violentamente al MC, aumenta su supervivencia y estimula su proliferación y su síntesis en un feed-back positivo para ejercer efectos más distantes sobre los LB de memoria y otras células hematopoyéticas. Los valores del NGF descienden en el estrés crónico pues se sintetizan auto-anticuerpos que lo anulan por un mecanismo aún desconocido. Similares efectos se constataron con la SP, lo que refuerza el efecto de los neuropéptidos (NPO) sobre los MC sin mediar un anticuerpo específico, lo cual explicaría las desgranulaciones explosivas ante agentes “inespecíficos” (cuadros anafilactoïdeos por medios de contraste yodado, ciertos fármacos, aditivos alimentarios, algunos cosméticos y elementos industriales).

Se podría señalar que el estrés **agudo** jugaría un papel destacado en la **RIC** mientras que el **crónico** no, y, por el contrario, en la **RIA** sería preponderante el estrés **crónico** y no el **agudo**. Quizás el tiempo necesario para producir cambios bioquímicos sea la clave para el diferente impacto del estrés sobre el sistema inmune. Por otro lado, el estrés **crónico** podría tener algún efecto sobre el estado atópico habida cuenta de la actividad sostenida de numerosos NPO sobre los **MC** y otras células involucradas. De ahí la preferencia de fármacos con acción **central** que minimizan a los NPO mientras que los que no la tienen inhiben sólo a las IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 y P-selectina, y no a los NPO.

La acumulación de MC se describió en varias inflamaciones incluyendo la artritis reumatoïde, desórdenes alérgicos como el asma, el aumento de crecimiento de algunos tumores y su capacidad invasiva. En el laboratorio se observó que el número de MC peritumorales aumenta a medida que el tumor progresa, pero su papel se desconoce. La principal función de los MC es regular las funciones vasculares al iniciarse la respuesta inflamatoria, y activar a otras células.

Los MC son una de las principales células efectoras del sistema inmune, y tienen un papel clave en la fase aguda de las reacciones alérgicas mediadas por la IgE. Además de ello, los MC intervienen en la remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, condiciones fibróticas, formación de vasos sanguíneos, respuesta del hospedador a parásitos y desórdenes inflamatorios crónicos y agudos.

Cuando los MC son activados, liberan sus gránulos citoplasmáticos que contienen mediadores inflamatorios y otros compuestos, que inducen la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso bronquial. La activación de los MC y la subsecuente exocitosis de los gránulos, es seguida por la producción y secreción de citoquinas que dirigen la infiltración leucocitaria y la inflamación local.

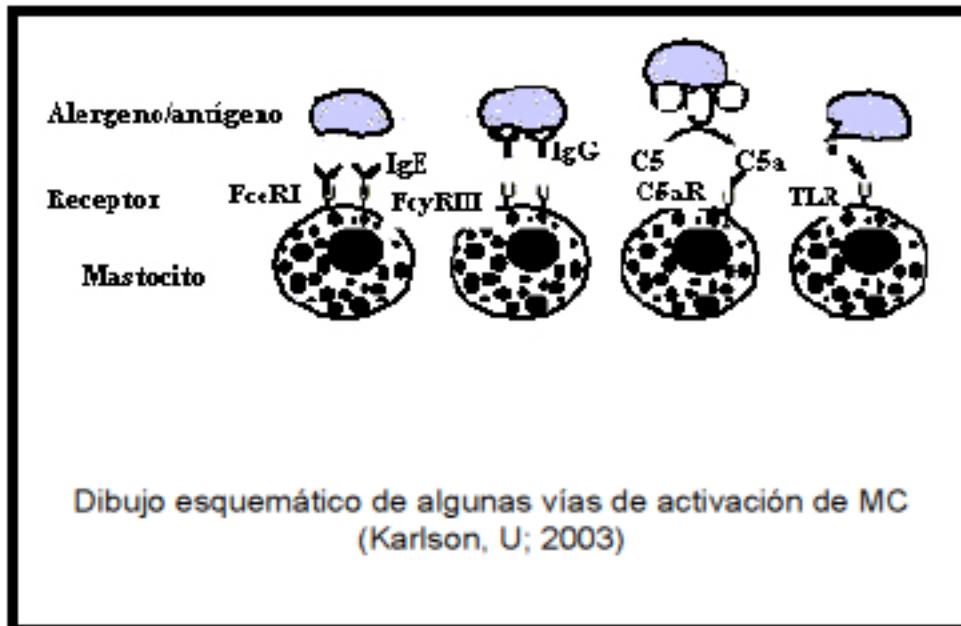
#### **El papel de los MC y de la heparina (H) en la angiogénesis:**

Los MC se acumulan en situaciones normales y patológicas donde se desarrollan procesos angiogénicos y su migración quimiotáctica al sitio de la neo-vascularización es inducida por los factores de crecimiento como el SCF (factor de crecimiento de células progenitoras), el VEGF (factor de crecimiento vascular-endotelial), el EGF (factor de crecimiento

epidérmico), el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), y el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas). Las proteasas liberadas por los MC, degradan la matriz del tejido conectivo y proveen un espacio para la formación de nuevos vasos. Existen evidencias que mediadores de los MC, como la histamina, la heparina, las enzimas colagenolíticas (quinasa, triptasa y MMPs) que degradan la MEC, y las potentes citoquinas pro-angiogénicas (4 isoformas del VEGF, bFGF, TGF-beta, TGF-alfa e IL-8), pueden, individual o sinérgicamente, estimular la angiogénesis. La angiogénesis tumoral disminuye en ratones deficientes de MC (W/W<sup>v</sup>) implantados con células del melanoma B16BU6, con una correlación entre el número de MC y la densidad de micro-vasos tumorales. Kessler y Folkman, implantaron tumores en la membrana corio-alantoidea del embrión de pollo y encontraron incrementada 40 veces la cantidad de MC, en torno al tumor implantado, antes de que arribaran nuevos capilares. Azizkhan y Zetter, hallaron que el lisado de MC estimuló la locomoción de las células endoteliales *in vitro*. Todos los productos de los MC fueron testeados y sólo la H pudo estimular esa locomoción y sustituir al lisado de MC. Si pequeñas cantidades de H (6-25 pg) se agregan al embrión de pollo, el crecimiento capilar (estimulado por el extracto tumoral) aumenta significativamente. Una fracción no coagulante de la H tuvo un efecto similar. Por estos experimentos se sospecha que parte de la molécula de H actúa como un regulador positivo de la angiogénesis. Klagsbrun y Shing, encontraron que la H puede unir en la superficie de las células endoteliales vasculares, a mitógenos celulares que son también angiogénicos. Estudios de Vlodavsky (1990), demostraron que la actividad angiogénica de la H es mediada por la interacción con el FGF. La H puede liberar bFGF de la MEC, y este factor de crecimiento actúa como un fuerte mitógeno de las células endoteliales.

#### **La activación del MC:**

Son activados por compuestos inmunológicos y no inmunológicos. La desgranulación inmunológica y no inmunológica presenta una apariencia similar, pero la cinética y la cantidad de los productos liberados varía, dependiendo de la estimulación inicial. La vía clásica de activación de los MC ocurre cuando un alérgeno interactúa con un anticuerpo IgE específico, que se une con alta afinidad al receptor-IgE (RFcεI) anclado en el MC, iniciando la señalización intracelular. Este acoplamiento produce la desgranulación y la transcripción de citoquinas inflamatorias. Se demostró que además de la IgE, también la IgG puede activar la desgranulación de los MC humanos por unión al RFcεI, y ser activados por neuropéptidos, factores del complemento, C3a y C5a, a través de los C3aR y C5aR (CD88). El NGF también activa a los MC a través de su receptor TrkA, como así también las lectinas por unión a la región Fc del RFcεI. Los receptores Toll-like (TLR), que son críticos en la activación de la respuesta inflamatoria pueden activar a los MC. Por interacciones entre los TLR con lipopolisacáridos (LPS) y proteoglicanos (PGN), los MC son directamente activados por bacterias, y contribuyen con la primera línea de defensa contra las infecciones bacterianas. (Fig. 9)



**Fig. 9:** Esquema de la activación del MC.

La H es importante en la progresión tumoral ya que aumenta la angiogénesis in vivo, y la migración y proliferación de las células endoteliales in vitro. Además, la H libera activador del plasminógeno del endotelio pudiendo contribuir a la lisis de la membrana basal, permitiendo así la migración de las células tumorales. Las proteasas de los MC del ratón incluyen 5 quinasas y 3 triptasas. Una de las proteasas presente en los MC (Tc) es la carboxi-peptidasa A, que es una metalo-proteasa dependiente del  $Zn^{2+}$  con actividad de exopeptidasa. Los MC humanos contienen triptasa, quinasa y carboxi-peptidasa A, todas unidas con la H en los gránulos. Además, los gránulos secretorios contienen metalo-proteasas de matriz (MMPs).

Las proteasas de los MC degradan la MEC, facilitando la migración de las células endoteliales, y la liberación de factores de crecimiento unidos a la H que actúan como compuestos pro-angiogénicos (como los VEGF, cFGF, y TGF-beta) y anti-angiogénicos (como las trombospondina-1, angiostatina y endostatina).

Además, la quimasa y triptasa actúan directamente como factores pro-angiogénicos.

La MMP-9 de los MC regula la angiogénesis y promueve la progresión tumoral. Se detectó en los MC una nueva proteasa relacionada con la granzima-B de los LT, la rMCP-8 (rat-mast-cell-protease-8), pero aún no se conoce su especificidad.

## Tabla 2.

### Mediadores de los MC.

<b>Mediadores preformados</b>	
Asociados a gránulos	Eluidos rápidamente
Heparin/condroitin sulfato	Histamina
Triptasas	Serotonina (en algunas especies)
Quimasas	Factores quimiotácticos para macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos
Metalo proteasas de matriz: MMP-2, MMP-9, y MMPs adicionales	
Elastasa	
Carboxipeptidasa	
AExoglicosidasas	
Activador de Plasminógeno	
Arilsulfatasa A	
Heparanasa	
<b>Mediadores sintetizados de novo:</b>	
<u>Prostaglandinas:</u> PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub>	<u>Citoquinas:</u> TNF-alfa, GM-CSF, SCF, IL-1-beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-14, IFN-gamma. BFGF, VEGF
Tromboxanos	
HETEs (Hidroxi-eicosatrienoicos)	
HPETEs(Hidroperoxi-eicosatrienoicos)	<u>Quimioquinas:</u> MIP-1-alfa, MIP-beta, MCP-1, linfotactina.
<u>Leucotrienos:</u> LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub> , PAF (factor activador de plaquetas).	

### Papel de los MC en la progresión tumoral:

Los MC se asociaron con los cánceres humanos, aunque su papel en el desarrollo tumoral es controvertido, pero hay unanimidad en el hecho de que su número umenta durante la progresión tumoral. Varios tipos de células tumorales expresan SCF y otros factores, que son quimio-atractivos para los MC, lo cual explicaría la asociación.

En la invasión y metástasis están involucrados la proliferación celular, la neovascularización, y la degradación de la MEC. En cada uno de ellos, los MC intervienen modificando el crecimiento tumoral, potenciando la angiogénesis o facilitando la invasión por las proteasas que clivan al colágeno tipo IV, la fibronectina, la elastina y los proteoglicanos o activando la pro-colagenasa de los fibroblastos y estimulando su secreción. Experimentos basados en la manipulación de los niveles del SCF demostraron que los MC están ligados con la angiogénesis. El incremento en la expresión de SCF por las células tumorales produjo una acumulación de MC, la cual indujo la aparición de nuevos vasos sanguíneos y del crecimiento tumoral.

Ratones deficientes en MC (W/W<sup>w</sup>) presentan una disminución de la angiogénesis asociada al tumor. En contraste, los MC participan en la defensa anti-tumoral inflamatoria por exhibir una citotoxicidad natural contra las células tumorales.

Ratones deficientes en MC (W/W<sup>w</sup>) muestran un incremento de metástasis e incidencia tumoral. Por ende, mientras que algunos investigadores no encuentran ninguna correlación entre el pronóstico tumoral y la infiltración de MC, otros señalan una correlación con valor pronóstico positivo o negativo. Por ejemplo, los carcinomas de mama con gran número de MC, tienen mayor supervivencia; sin embargo, el carcinoma de intestino con una plétora de MC presenta metástasis.

En el caso del pulmón, un elevado número de MC presenta un pronóstico menos favorable. Contrariamente, muchos MC en el carcinoma cervical se asocia con una mayor supervivencia. La histopatología de los sarcomas muestra que los poco agresivos poseen gran número de MC.

Dos hipótesis tratan de explicar esta controversia:

1) : los MC promueven una reacción de defensa del organismo contra el tumor:

Los MC peri-tumorales se interpretan como una respuesta anti-tumoral del hospedador. Así, los MC como sus productos de desgranulación, tendrían un efecto protector del organismo contra los tumores o serían citotóxicos para los tumores in vitro. El TNF $\alpha$  es citotóxico y es sintetizado por los MC, y sería el responsable de tal reacción. Se señaló que la incidencia de tumores inducidos experimentalmente en ratones genéticamente

deficientes en MC (W/Ww) es significativamente mayor que en ratones que tienen un número normal de MC, como es el caso de las metástasis pulmonares del melanoma B16 en los deficientes de MC y no en los normales.

Otros experimentos muestran que los MC aumentan durante la progresión tumoral e inhiben el crecimiento in vitro, y la incidencia tumoral in vivo de un adenocarcinoma mamario murino. Existen evidencias que la H, secretada por los MC, sería la responsable de los efectos observados, pues se demostró que las células tumorales poseen receptores específicos para ella, y ésta es capaz de inhibir su proliferación.

**2):** los MC promueven el crecimiento tumoral y las metástasis:

Se postula que las células tumorales alterarían la reactividad de los MC, obteniendo ventajas de ellos, alterando la MEC, favoreciendo la migración y la neo-vascularización. Los MC activados por los tumores descargan sustancias que promoverían su crecimiento. Estudios in vitro muestran que los productos de los MC aumentan la proliferación de las células tumorales. Estas observaciones están sustentadas por experimentos realizados in vivo con adenocarcinomas mamarios de rata que muestran que una supresión farmacológica de la actividad de los MC resulta en una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Por otro lado, los MC se caracterizan por su habilidad de sintetizar y liberar numerosas moléculas activas. Así, a través de sus mediadores, los MC pueden actuar directamente sobre algunos pasos críticos del desarrollo tumoral como la neo-vascularización, invasión y metástasis.

#### **La matriz extracelular (MEC):**

La MEC es una malla fibrilar organizada, que sirve como sustrato para la adhesión celular y la migración. Mantiene la integridad tisular, regula la difusión molecular y transferencia de estímulos. Forma un microambiente celular dinámico, el cual juega un importante papel en la determinación del fenotipo celular.

Está formada por colágeno, glicoproteínas de adhesión como fibronectina y laminina, proteoglicanos y glicosamino-glicanos. Media la información desde y hacia las células, modulando la función de factores de crecimiento/citoquinas y factores regulatorios como la producción de enzimas y sus inhibidores.

La MEC incluye la membrana basal (MB) y el estroma intersticial. Este está formado por células de tejido conectivo como fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, y M. Presenta una malla de colágeno y elastina embebidas en una sustancia amorfa. La MB separa las capas de células epiteliales y endoteliales de las células subyacentes del estroma. Al microscopio electrónico está formada por 3 capas laminares: la que está vecina a las células o lámina rara o lúcida, la segunda capa o lámina densa y una tercera capa o lámina fibro-reticular, con fibrillas colágenas, que se continúa con el estroma intersticial.

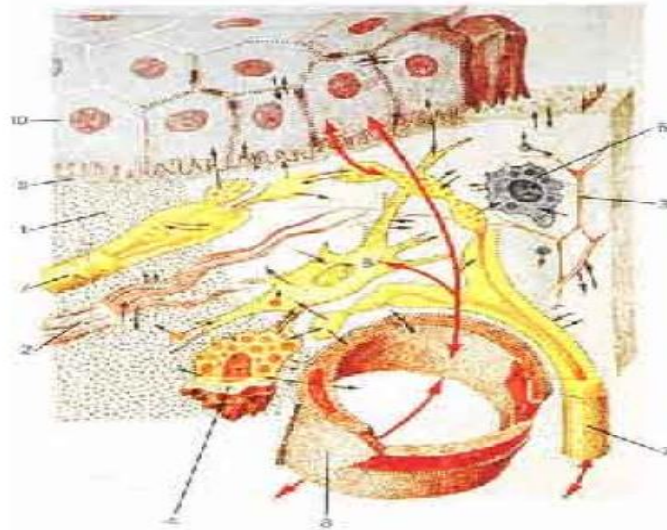
Los 4 tipos de moléculas de la MB son el colágeno tipo IV, el perlecan (proteoglicano de heparan-sulfato) la laminina y la entactina. En condiciones normales, la MB y el estroma intersticial, forman una barrera impermeable a células y macromoléculas. En el sitio de contacto de la MEC con un tumor invasivo, ésta es digerida por proteasas liberadas por el tumor, permitiendo el pasaje de células y macromoléculas.

En la transición del carcinoma in situ al invasivo, las células neoplásicas penetran la MB e ingresan en el estroma intersticial. Desde allí, tienen acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos, para diseminarse.

Una hipótesis de 3 pasos describe la secuencia de eventos bioquímicos que ocurren durante la invasión de las células tumorales a la MEC. El primer paso es el anclaje de las células tumorales por sus receptores de superficie, a la laminina y la fibronectina. Luego, las células tumorales ancladas, secretan hidrolasas (o inducen a las células del hospedador a secretarlas) las que degradan a la MEC (incluyendo la degradación de componentes de anclaje). Esta lisis se localiza en una región cercana a la célula tumoral. Finalmente, el tercer y último paso es la migración de las células tumorales hacia la región de la MEC modificada por proteólisis. Estos pasos se reiteran cíclicamente durante la invasión y son cruciales en la diseminación metastásica de las células tumorales.



**Fig.10:** Estructura de la MEC.



**Matriz extracelular**  
1) glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glicoproteínas; 2) fibras de colágeno; 3) elastina; 4) mastocito; 5) macrófago; 6) fibroblasto; 7) axones terminales; 8) capilar; 9) membrana basal; 10) células epiteliales.

#### **Alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión:**

En la invasión de las células tumorales, la pérdida de contacto entre ellas es por la interrupción de las uniones célula-célula y célula-MEC. La pérdida de la cohesividad se debe a la alteración de la expresión y función de las moléculas de adhesión. Estas impiden la migración e invasión de células dentro del estroma circundante por la adhesión célula-célula y célula-MEC.

La familia de los receptores de las integrinas, las cadherinas y la super-familia de las inmunoglobulinas, tiene un papel importante en la migración de las células tumorales y contribuyen a las metástasis. Por ello, las moléculas de adhesión son el blanco para las terapias anti-neoplásicas. No sólo son importantes en el diagnóstico como marcadores de malignidad, sino que son relevantes en el tratamiento, al inhibir la formación de las metástasis.

#### **Las cadherinas:**

Son glicoproteínas de membrana, que median la adhesión célula-célula en forma  $Ca^{2+}$  dependiente. Se expresan en la superficie de células adyacentes y se unen entre sí (unión homotípica), para mantener las células juntas y conservar la arquitectura tisular. Participan en el desarrollo de órganos y vasos, y en la cicatrización de las heridas. Se las bautizó de acuerdo a su ubicación en: E-cadherina de las células epiteliales, la N-cadherina del tejido neural, y la P-cadherina de la placenta.

La región citoplasmática (COOH-terminal) está conectada al cito-esqueleto de actina por proteínas de la familia de las cateninas. Los complejos cadherina-catenina, favorecen la adhesión entre células, y, generan señales que regulan la proliferación y migración. En ratas, las células tumorales con baja expresión de E-cadherina y catenina aumentan su capacidad de penetrar en la circulación vascular y de generar metástasis. La expresión reducida de E-cadherina en el carcinoma de mama es un indicador de baja supervivencia; en los carcinomas colorrectal y gástrico, una expresión reducida de E-cadherina y catenina se relaciona con mayor invasividad de las células tumorales.

Se afirma que la supresión de la expresión de la E-cadherina es uno de los principales eventos moleculares responsables de la disfunción en la adhesión célula-célula.

Los tumores tienen una arquitectura celular anormal, y pierden la integridad tisular lo cual dirige la invasión local. La pérdida de la proteína supresora del tumor E-cadherina se



correlaciona con mayor invasividad y metástasis tumoral, por lo cual el gen que la codifica es referido como un gen supresor de la invasión.

#### **Las integrinas:**

Son glicoproteínas de superficie que funcionan como receptores para moléculas de la MEC o como moléculas de adhesión célula-célula. Están formadas por 2 subunidades transmembrana, (heterodímero), una  $\alpha$  (con 16 tipos diferentes) y una  $\beta$  (con 8 tipos diferentes) en una unión no covalente. Las selectinas y los proteoglicanos también intervienen en la fijación. La subunidad  $\alpha$  está dividida en 2 segmentos que se mantienen juntos por una unión bisulfuro.

Participan en la agregación plaquetaria, la inflamación, la respuesta inmune, la cicatrización de las heridas y en la patogénesis de las metástasis tumorales.

La especificidad del ligando es el resultado de la combinación de los dominios extracelulares de ambas cadenas. Las integrinas reconocen moléculas de la MEC como la laminina, el colágeno, la fibronectina y la vitronectina; la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) de estas moléculas es uno de los sitios de unión.

Otras integrinas participan en la adhesión célula/célula, por moléculas de la super-familia de las inmunoglobulinas. Al regular la adhesión, participan en el proceso de metastatización.

#### **La super-familia de las inmunoglobulinas:**

Son glicoproteínas que tienen en su porción extracelular, múltiples dominios parecidos a los de las inmunoglobulinas. Participan en las interacciones célula/célula, ya sea manteniendo unidas a células de igual o distinta estirpe. Los cambios en su expresión durante la oncogénesis favorecen la formación de agregados celulares y/o interfieren en la adhesión de células tumorales con leucocitos, alterando la respuesta inmune.

Las más importantes son la N-CAM y la I-CAM. La primera o molécula de adhesión de las células neurales es mediadora de la adhesión homotípica, manteniendo unidas células que expresan N-CAM. Hay isoformas de ella, producidas por «splicing» alternativo a partir de un mismo gen; las principales son las de 180 kDa, de 140 kDa (trans-membrana) y de 120 kDa (soluble). Kibeelaar investigó la expresión de N-CAM en carcinomas de pulmón resecados quirúrgicamente con el uso de anticuerpos contra epitopes de N-CAM. Sólo el 20% de los carcinomas de células no pequeñas expresaron N-CAM, y el tiempo de supervivencia fue menor en los pacientes N-CAM positivos, que en los pacientes N-CAM negativos. Como estos carcinomas expresan N-CAM, esta molécula se ha propuesto como marcador diagnóstico. (Ledermann JA, et al., 1994).

La molécula de adhesión intercelular 1, (ICAM-1), se expresa en LB, LT, fibroblastos, keratinocitos, y células endoteliales. En las neoplasias pulmonares la expresión del ICAM-1 depende del tipo histológico. En líneas celulares provenientes de carcinomas epidermoides y de carcinomas de células grandes se expresa ICAM-1 en su superficie, mientras que en las provenientes de carcinomas de células pequeñas no se expresa.

Así, la disminución en la expresión del ICAM-1 favorece el proceso de metástasis. Esto explicaría la supervivencia mayor en los pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

Una forma soluble de ICAM-1 (sICAM-1) existe en el suero de los sujetos sanos. En las neoplasias pulmonares, la expresión de sICAM-1 exhibe niveles más altos que en los controles sanos. En el carcinoma pulmonar de células no pequeñas existe una correlación positiva entre la concentración sérica de sICAM-1 con: a) el tamaño del tumor primario; b) la etapa clínica; y c) el potencial metastático.

Melis, investigó la actividad de sICAM-1 en fluidos pleurales de pacientes con cáncer. Halló que sICAM-1 es liberada de la superficie celular antes de ser sintetizada de novo. La expresión de sICAM-1 está regulada por M que liberan sICAM-1 por un mecanismo dependiente del TNF $\alpha$ . Además, sICAM-1 tiene un papel clave en la inmunosupresión, al inhibir la adhesión de LTCD8<sup>+</sup> a las células tumorales.

#### **Las selectinas:**

Poseen una estructura unitaria homóloga con las inmunoglobulinas. Median las

interacciones hetero-típicas entre las células endoteliales y los PMN, que se requieren para la extravasación al tejido blanco durante el proceso inflamatorio. La familia de las selectinas consta de 3 miembros: la E-selectina, la L-selectina, y la P-selectina.

Las E-selectinas aparecen en el endotelio vascular por estimulación de las citoquinas. Las L-selectinas se expresan en casi todos los PMN. Las P-selectinas si bien, se encontraron en las plaquetas activadas, su expresión es inducida en el endotelio vascular, son almacenadas como proteínas trans-membrana preformadas en gránulos citoplasmáticos, y son translocadas a la superficie celular bajo estimulación. Los ligandos para las L-selectinas están en las células endoteliales mientras que los ligandos para las E- y P-selectinas se hallan en los PMN. La E-selectina participa en la adhesión de las células del cáncer de colon al endotelio vascular. Los vasos sanguíneos de las lesiones tumorales invasoras expresan E-selectina y P-selectina, y también ICAM-1. El aumento de los niveles séricos de E-selectina augura un pronóstico desfavorable en el cáncer de mama, y, en el pulmonar de células pequeñas.

#### **El citoesqueleto de actina:**

Es una red de polímeros de actina y de proteínas asociadas. Participa en el citoplasma generando fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a señales extracelulares. Está involucrado en la regulación de la forma, la motilidad y la adhesión celular, por lo que alteraciones en su función contribuyen a la transformación maligna. Interacciona tanto con moléculas intracelulares como con los receptores de adhesión, conectando así el microambiente externo con el interior de la célula. Los cambios en el cito-esqueleto modulan la actividad de los receptores de adhesión y de los oncogenes, participando así de la progresión tumoral.

En las células normales, los micro-filamentos de actina son muy estables, y por ello, las células tienen muy poco movimiento; en las células cancerosas la desorganización del cito-esqueleto de actina impide la formación de contactos célula/célula y facilita la migración. En el cáncer de pulmón hay cambios en el cito-esqueleto y en las proteínas asociadas a éste.

Desde 1995, se sabe que los carcinomas pulmonares metastásicos tienen la actina polimerizada (F-actina) disminuida y un decremento en la integridad del cito-esqueleto.

Las funciones de la actina del cito-esqueleto son moduladas por vías de señalización iniciados en la membrana plasmática, sobre receptores de proteínas tirosina-kinasa que activan a Ras. La super-familia de proteínas Ras, que incluye la familia de proteínas Rho, son parte de las vías de señalización. Algunas de las proteínas de esta super-familia o de sus reguladores son oncogénicas, y, las mutaciones o sobre-expresión de éstas se hallan implicadas en distintos tipos de cáncer.

#### **Las proteasas: clasificación y su importancia en la invasión tumoral.**

La degradación de la MEC y la migración de la célula tumoral son eventos complejos que requieren la producción, liberación y activación de enzimas degradantes de la MEC. Está probada la sobre-expresión de enzimas en todas las células del microambiente hospedador-tumor. Para el proceso de invasión, es necesaria una producción de enzimas por las células tumorales y por las células de los tejidos adyacentes, y una extensa lisis de los componentes de la MEC. Así, la célula tumoral invasora usa la proteólisis de manera organizada, espacial y temporalmente.

La degradación tisular normal y de ciertas enfermedades es similar a la que ocurre en el cáncer. Pero, las células tumorales además: 1) : inducen la producción de proteasas en las células vecinas, por la secreción de citoquinas y/o factores de crecimiento, y también de sustratos para las proteasas, como las formas latentes de TGF- $\beta$ , que son activadas proteolíticamente por MMP-2 y MMP-9 ; 2) : producen y secretan ellas mismas sus proteasas, o bien, 3): producen factores que inhiben o activan proteasas locales.

Las proteasas se agrupan en 4 familias:

##### **1.- Las serino-proteasas:**

Comprenden a los activadores del plasminógeno, que lo convierten en plasmina y desempeñan un papel importante en el proceso de coagulación.

La activación del plasminógeno es una cascada proteolítica que, con otras enzimas,

participa en la degradación de la MEC durante la remodelación tisular normal y patológica, incluyendo la invasión metastática. Hay 2 tipos genética e inmunológicamente diferentes de estas enzimas: el tipo urokinasa -uPA- (Urokinase-type-plasminogen-activator) y el tipo tisular -tPA- (tissue-plasminogen-activator).

La uPA es una enzima que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina activa. La plasmina, una proteinasa neutra de amplia especificidad, se une a receptores de las células tumorales (Miles LA, Plow EF, 1988), y desarrolla una amplia actividad fibrinolítica catalizando la degradación de componentes de la MEC incluyendo fibrina, fibronectina, colágeno tipo IV, vitronectina y laminina.

La plasmina activa a otras proteasas, amplificando la reacción. Así, por la activación de la uPA se produce la ruptura de muchas proteínas de la MEC. La uPA se sintetiza y secreta por las células tumorales y estromales en forma de una pro-enzima inactiva (pro-uPA), que se une a receptores específicos de la superficie de las células tumorales.

Tras esa unión, la pro-enzima es activada por la plasmina, la calicreína o las catepsinas B y L. De este modo, los receptores de la uPA son esenciales en la migración de la célula tumoral, al permitir la regulación de la actividad proteolítica en los contactos celulares mediante las diferentes localizaciones de la uPA y sus inhibidores. Se sugiere que la uPA desempeña un papel en la progresión de los carcinomas humanos. Los valores intra-tumorales elevados de la uPA se asocian con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama y de colon. (Mulcahy A, 1994), gástrico (Nekarda H, 1994), pulmonar (Pedersen H., 1994), vejiga (Hasui Y, 1992) y gliomas (Hsu D., 1995).

La actividad resultante de la uPA dependerá del equilibrio con su inhibidor natural específico PAI-1 (plasminogen-activator-inhibitor), producido por las células tumorales. Los valores intra-tumorales del receptor para la enzima son importantes en el proceso de invasión tumoral. Se demostró la significación pronóstica de los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1).

Así, en relación con el inhibidor de la uPA (PAI-1) se detectó que, los valores elevados del éste están asociados con un mal pronóstico en el cáncer de mama (Jänicke F, 1991) y en el del cérvix uterino (Kobayashi H, 1994).

También se señaló que los valores elevados del inhibidor del tPA (PAI-2) se asocian a un mejor pronóstico en el cáncer mamario (Foekens JA, 1994).

A pesar de la discordancia, son mayores los efectos de los inhibidores de las proteasas en la patología tumoral.

El PAI-1 tiene un papel importante en la angiogénesis, como un factor adverso de los tumores (Montesano R, 1990). La liberación del PAI-1 sería importante en la reimplantación de las células tumorales, ya que el nuevo estroma en las metástasis, requiere el bloqueo de la degradación de la MEC ocasionado por la uPA.

## 2.- Las cisteíno-proteasas:

Son dependientes de la cisteína, como las catepsina B y L. Participan en la invasión de las metástasis. La catepsina B que es lisosomal, está en la membrana plasmática de las células tumorales, y en el medio de líneas celulares cultivadas in vitro. Es importante para degradar proteínas de la MEC, y para convertir el pro-uPA inactivo, en un uPA-uPAR, o uPA, enzimáticamente activo de las células tumorales.

Por su parte, la catepsina L que degrada a las proteínas de la MEC, como el colágeno, la laminina y la elastina, posee actividad proteolítica más alta que la de la catepsina B, pues también activa al pro-uPA.

## 3.- Las aspártico-proteasas:

Son dependientes del aspartilo, como la catepsina D, que es una enzima lisosomal. Johnson, en 1993, halló una correlación entre la catepsina D y la conducta invasiva de líneas celulares mamarias. La sobre-expresión de la catepsina D estimula la proliferación celular de focos de micro-metástasis en ratones (Liudet E, Derocq, A, 1995). Facilitaría el crecimiento de las células tumorales en sitios distantes por: 1): la inactivación de los inhibidores del crecimiento, 2): la activación de los factores del crecimiento, ó 3): por su interacción con receptores para los factores del crecimiento .

#### 4.- Las metalo-proteasas:

Denominadas proteasas de la matriz (MMPs), son enzimas dependientes del  $Zn^{2+}$  que degradan moléculas de la MEC. Las metalo-proteasas son producidas por muchas células y son secretadas en forma inactiva (pro-metalo-proteasas). Originariamente, las MMPs fueron consideradas en la invasión y en las metástasis; pero, estudios recientes revelaron que las MMPs están involucradas en la progresión tumoral.

Estas enzimas regulan el crecimiento de las células tumorales, la diferenciación, la apoptosis, la migración e invasión, la regulación de la angiogénesis tumoral y la vigilancia inmune.

#### **La familia de las metalo-proteasas de la matriz (MMPs):**

Más de 21 MMPs humanas y sus homólogas de otras especies, clivan cualquier componente de la MEC. Históricamente, se dividieron en colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas, en base a su especificidad por los componentes de la MEC. Pero, como los sustratos de las MMPs han crecido, se adoptó para su denominación un sistema secuencial de numeración, y las MMPs son ahora agrupadas de acuerdo a su estructura. Existen 8 clases diferentes de MMPs: 5 son secretadas y 3 son MMPs de tipo membrana (MT-MMPs). Estas están covalentemente unidas a la membrana celular, pero las MMPs secretadas, pueden localizarse en la superficie celular unidas a integrinas, al CD44, o a proteoglicanos heparan-sulfato, al colágeno tipo IV o al inductor de MMPs (EMMPRIN) el cual estimula la síntesis de MMPs en los fibroblastos.

#### **La regulación y activación de las MMPs:**

Se sabe que las MMPs tienen diferentes sitios de regulación: a) a nivel transcripcional a través de factores de crecimiento y citoquinas, b) a nivel post-transcripcional, por cambios en la estabilidad del ARNm, y c) a nivel post traduccional, a través de la activación de la forma latente secretada.

Pueden ser inhibidas por los inhibidores endógenos de las metalo-proteasas (TIMPs). La regulación transcripcional es el punto más importante para la expresión de la metalo-proteasa latente. Hay mecanismos reguladores extracelulares que controlan el nivel de degradación de la MEC. La activación de la enzima es auto-catalítica y da lugar a la pérdida de un péptido amino terminal. Las MMPs se activan in vitro por agentes como los detergentes, los compuestos órgano-mercuriales y las enzimas como la plasmina, la tripsina, la calicreína y la estromelina.

El agente activador inducirá un cambio conformacional en la molécula de la pro-enzima para que pueda interactuar con el Zinc<sup>2+</sup> y así activarse.

#### **Los sustratos de las MMPs:**

El clivaje de la MEC por las MMPs genera fragmentos con nuevas funciones. Así, el clivaje de la laminina-5 y el colágeno tipo IV da lugar a la exposición de sitios crípticos que promueven la migración. Las MMPs tienen como sustratos a los receptores de los factores de crecimiento y las moléculas de adhesión. El receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR-1) es clivado por la MMP-2. Los dominios extracelulares de los receptores son liberados, y funcionan como receptores señuelos para sus respectivos ligandos.

El clivaje de la E-cadherina y del CD44 libera los fragmentos de los dominios extracelulares de estas moléculas de adhesión, y produce un aumento del comportamiento invasivo. También el clivaje de la subunidad  $\alpha V$  de la integrina por la MMP-14 aumenta la migración de las células tumorales. Finalmente, las MMPs clivan y activan a sus propias formas inactivas, y a otras MMPs e inhibidores de proteasas como las serpinas.

#### **El sistema de inhibición de las MMPs:**

Las MMPs son reguladas por inhibidores de metalo-proteasas o TIMPs del microambiente celular. Inhiben formas activas de MMPs, y hasta formas latentes de MMPs. La alteración de este balance conduce a patologías tisulares. Las MMPs activas son inactivadas por  $\beta$ -macro-globulinas, como la  $\beta$ -2-macroglobulina.

Los TIMPs son moléculas producidas por las células que sintetizan las MMPs o por células

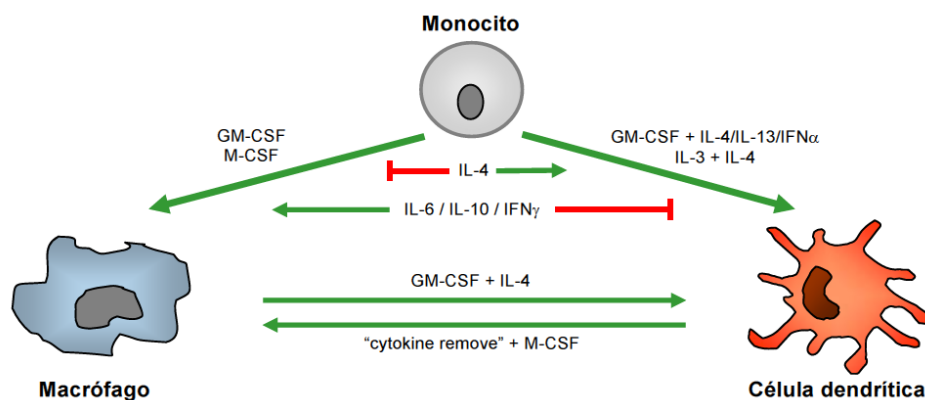
vecinas, lo que permite controlar la proteólisis peri-celular en situaciones normales. Los inhibidores de las MMPs son: el TIMP-1, el TIMP-2, el TIMP-3 y el TIMP-4.

Los 2 primeros se los vincula con la invasión y las metástasis. Los inhibidores se unen con alta afinidad en una relación molar 1:1 a MMPs activas, lo que origina una pérdida de la actividad proteolítica. El papel de los TIMPs en la invasión y metástasis se discute, ya que en algunos casos los TIMPs favorecen la progresión del tumor: TIMP-1 y -2 inhiben la apoptosis de la célula tumoral, TIMP-2 y -3 promueven el crecimiento de la célula tumoral, y TIMP-1 promueve la angiogénesis.

Los altos niveles de TIMP-1 y TIMP-2 son de mal pronóstico, pues son mitógenos para muchas células y se unen en la superficie celular.

#### Los monocitos:

Se originan en la médula ósea a partir de un precursor mieloide y se liberan al torrente sanguíneo, donde constituyen un 10% de los leucocitos humanos [11]. Tienen una vida media corta (24-72 horas), y renuevan a los M y CD. Son heterogéneos en morfología, marcadores de superficie y capacidad fagocítica, y exhiben gran plasticidad en su diferenciación, Así, el fenotipo y las funciones de los M residentes en los tejidos (M alveolares, células de Kupffer, microglia, osteoclastos) varían considerablemente. Por ejemplo, los M son inducidos a adquirir propiedades fenotípicas y funcionales de CD, mientras que las CD derivadas de monocitos (MDDC) in vitro, pierden sus funciones efectoras al retirar las citoquinas que promueven su generación. [13] Dicha plasticidad se valora en la resolución de la inflamación, donde células apoptóticas facilitan la transformación de M citotóxicos/pro-inflamatorios en promotores de crecimiento/anti-inflamatorio para reparar y limitar el daño tisular asociado.



**Fig. 11:** Diferenciación in vitro de monocitos. Esquema ilustrativo de la plasticidad y la estímulo-dependencia de la diferenciación de monocitos de sangre periférica.

Las citoquinas son el estímulo para que los monocitos progresen hacia su diferenciación. La diferenciación in vitro de monocitos a M o CD es un ejemplo de dicha dependencia. (Fig. 11). Las citoquinas empleadas para generar MDDC in vitro, son las GM-CSF e IL-4, mientras que los M se diferencian con los GM-CSF o M-CSF. En humanos, IL-4 favorece la diferenciación a CD e impide la generación de M, mientras que la IL-6 limita su generación y promueve a los M dependientes del M-CSF. [12]

Los factores de transcripción, el PU.1 junto con C/EBPa, RUNX1 y AP-1, son críticos en la diferenciación monocítica, pues los ratones deficientes en PU.1 carecen de linaje mielomonocítico, por su papel esencial en la regulación de los genes que codifican los receptores de los GM-CSF, M-CSF y G-CSF.

#### Las células dendríticas (CD):

Son células de linaje mieloide, que junto a los monocitos-M y a los LB, constituyen el grupo de las células presentadoras y procesadoras de los antígenos (CPA), y son el primer eslabón de la RIA. Estas CPA clivan a los antígenos (Ag) nativos en péptidos pequeños que son presentados en el contexto del CMH a los LT específicos. Las CD son importantes en la respuesta inmune primaria dado que son las únicas CPA que presentan Ag a los LT

vírgenes. Los LB y los monocitos-M sólo presentan el Ag a los LT de memoria. Las CD son un componente minoritario de los mononucleares periféricos en humanos <sup>[15]</sup>, y son las estimuladoras más potentes en los cultivos leucocitarios mixtos y en la activación de los LTCD8+. Poseen moléculas de clase II del CMH, receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, y para el factor C3 del sistema complemento. Las CD presentan antígenos exógenos en el contexto del CMH-II y CMH-I (“cross-priming”), e inducen respuestas inmunitarias primarias o promover tolerancia. <sup>[16]</sup> Aún más, las CD determinan la polarización de los LTh naive hacia Th1 (productores de IFN- $\gamma$  y eficaces en la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (productores de IL-4 y efectivos en la eliminación de patógenos extracelulares), Th17 (productores de IL-17 e implicados en respuestas autoinmunes) o LT-reg (o LT reguladores-inmunosupresores). <sup>[17]</sup>

Las CD humanas se clasifican en 2 grupos: las CD mieloides y las CD plasmocitoides. Las mieloides (CD11c+ CD123-), se distribuyen en todos los tejidos y se denominan por su localización en células de Langerhans (en epidermis y mucosas), CD dérmicas, CD tímicas, o CD intersticiales. Las CD mieloides circulantes son un 0.5% del total.

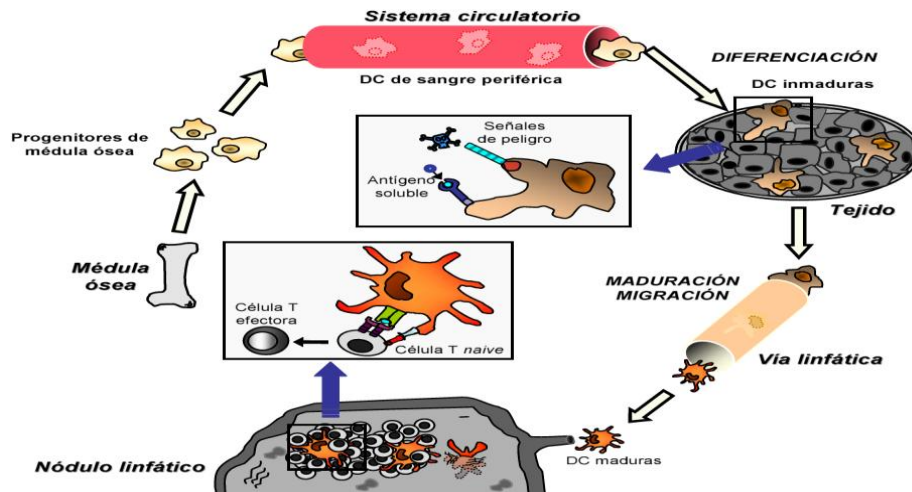
Por el contrario, las CD plasmocitoides o linfoides (CD11c- CD123+) proceden de progenitores del timo y de áreas T de los órganos linfoides secundarios, y residen en ganglios linfáticos, bazo, timo, médula ósea y sangre periférica. Son mediadoras de la inmunidad anti-viral, produciendo cantidades de IFN- $\alpha$  al ser estimuladas.

Las CD mieloides se originan en la médula ósea, que generan precursores circulantes cuya extravasación a los tejidos da lugar a las CD inmaduras residentes (CDi). (**Fig. 12**). Las células inmaduras, en ausencia de inflamación y de respuesta inmune, se encuentran “patrullando” los tejidos periféricos, el sistema sanguíneo y linfático y los órganos linfoides secundarios. Las CDi responderán frente al reconocimiento de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) o por receptores Fc y/o receptores del complemento. Se activarán al reconocer señales de alerta en el micro-ambiente, tales como mediadores de la respuesta inflamatoria (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE-2, etc.) o moléculas intracelulares provenientes de células necróticas o dañadas (HSP, ATP, UTP, ácido úrico).

En respuesta a estas señales, las CDs se diferencian, madurando y convirtiéndose en (CPA) profesionales para activar a LT vírgenes. La maduración implica: 1): expresión de los receptores de quimioquinas y migración de las CDs a los órganos linfáticos, 2): baja notable de su capacidad endocítica, 3): aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, y, 4): incremento en la expresión de complejos péptido-antigénico/CMH clases I y II.

Su capacidad fagocítica les permite captar y procesar antígenos que son unidos a las moléculas del CMH. La detección de “señales de peligro” por los receptores Toll (TLR) y proteínas NOD, hace que las CD maduren y migren a los órganos linfoides secundarios. En las áreas T de los ganglios linfáticos, las CD interaccionan con los LT que portan un R $\alpha$ T específico para los antígenos que las CD capturaron en los tejidos de origen, iniciando la RIA. Las CD maduras presentan antígenos a los LT CD8+ y CD4+, y éstos a su vez regulan a otras células, como LTCD8 y LB específicos de antígeno, o células inespecíficas como M, eosinófilos y NKC.

Recientemente, se ha planteado la discusión si las CD no constituyen una población celular diferente de los M. Las CDs funcionan como nexo entre la RIC y la RIA. La producción de citoquinas contribuye a la homeostasis generando una estimulación eficiente. Las CDs producen citoquinas, que están vinculadas con funciones especializadas, siendo la IL-12 y el TNF- $\alpha$ , las más conspicuas. La IL-12 es esencial para la activación/maduración de las CDs, promoviendo la producción de IFN- $\gamma$  de los LT, que juega un papel en la respuesta del tipo Th1. La habilidad de las CDs de producir o no IL-12, depende de muchos factores, siendo uno de ellos, la activación del CD40 por un estímulo microbiano.



**Fig. 12:** - “Ciclo vital” de las CD. Se diferencian a partir de progenitores de médula ósea que llegan a los tejidos a través del sistema circulatorio, donde residen como CD inmaduras hasta que reciben señales que promueven su migración y maduración. Las CD maduras migran a los ganglios linfáticos, donde activan y polarizan a los LT naives hacia los tipos de células T.

La expresión de IL-12 por las CDs estimuladas es modulada por otras citoquinas, como, las IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , CCL2 y TGF- $\beta$ . La activación de las NK depende de la IL-12 de las CDs. Otras citoquinas de la familia de la IL-12, son las IL-23 e IL-27. El TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria que actúa en las RIC y RIA. Su expresión por las CDs es una respuesta a la maduración / activación. Cumple una función tanto autócrina como parácrina, pues induce la migración de las CDs desde los tejidos periféricos a los ganglios drenantes. Las CDs producen IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IFN- $\gamma$ , y quimioquinas.

#### **Como actúan las CDs en la respuesta inmune. La activación de los LT.**

La interacción de las CDs con los LT vírgenes perfilan la respuesta hacia diferentes fenotipos e incluso inducen tolerancia de los LT. Esto dependerá de: 1) el subtipo de CDs, ; 2) los receptores estimulados; 3) el tipo y la dosis del antígeno, 4) la vía de inmunización y 5) el micro-ambiente circundante a la CPA.

El LT, en contacto cercano con la CDs madura, requiere 2 señales para activarse: señal 1, dada por el reconocimiento del péptido antigénico presentado por el CMH I y II, a través del RcT, que involucra a sitios no polimórficos de las moléculas del CMH I y II por parte de los receptores de CD8 y CD4; la señal 2, es provista por moléculas co-estimatorias en las CDs (CD80 y CD86), que interactúan con sus ligandos, expresados en el LT (CD28).

Si bien las TNF- $\alpha$  e IL-12 no se mencionan como señales para una activación de las CDs hacia los LT vírgenes, son de importancia, para la maduración/activación de las CDs, como para la proliferación y activación de los LT. La presentación antigénica ocurre cuando un fragmento peptídico en el CMH-II, en la membrana de la CD contacta al LT-CD4 virgen a través de su RcT para el antígeno.

Las CDs son 100-300 veces más eficientes que cualquier otra célula presentadora de antígenos. Esta capacidad de las CDs mieloides para activar a los LT, in vivo, ha sido demostrada en experimentos de transferencia celular en ratones. Así, la reinyección en la almohadilla plantar o por vía intravenosa, de CDs estimuladas, in vitro, con antígenos proteicos, induce respuestas de LT específicas del antígeno. Si durante el proceso de maduración de CDs resulta ser inmunogénica, los clones T se diferenciarán a LT cooperadores o helper (Th) o LT CD4, y a LT citotóxico (CTL) o LTC8D8. Estos actúan en la erradicación o control de las infecciones virales y en la respuesta inmune anti-tumoral. Los LTh, no constituyen una población homogénea y pueden diferenciarse en Th1, Th2 y Th17, a las cuales se ha sumado la población Th9.

Estas subpoblaciones difieren en la forma de inducción, los patrones de circulación, el perfil de citoquinas que producen y los mecanismos efectores que activan. Si la CDs produce IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras, los LT CD4 se diferenciarán hacia un perfil Th1, productores de IFN- $\gamma$ , IL-2 y linfotóxica- $\beta$  y son esenciales en la respuesta inmune mediada por células fagocíticas, frente a patógenos intra-vesiculares. El IFN- $\gamma$  producido por los LTh1 estimula la actividad microbicida de las células fagocíticas, y la destrucción intracelular de los micro-organismos. El IFN- $\gamma$  estimula la síntesis de anticuerpos IgG y fijadores del complemento, que facilitan la fagocitosis. Los LTh1, por la interacción CD40-CD40L (ligando), aumentan la capacidad de las CDs de estimular a los LTCD8 facilitando la respuesta citotóxica.

En la diferenciación hacia un perfil Th2 es crítica la presencia de IL-4 (producida por las células NKT y los Mc), donde las CDs estimulan al LTCD4 en ausencia de IL-12. Esta respuesta emerge por los helmintos y alérgenos, que producen una estimulación crónica de los LT, donde participan la IgE, los eosinófilos y los Mc. Los LTCD4-Th2 colaboran con los LB promoviendo la diferenciación a plasmocitos generadores de anticuerpos, importantes en la erradicación de helmintos y patógenos extracelulares.

Las CDs inducen la diferenciación a LT de memoria que persistirán por largos períodos, para responder ante una re-exposición al antígeno. Así, en ausencia de colaboración de los LT-CD4 con las CDs, la memoria en la respuesta LT-CD8 se halla comprometida.

#### **El papel de las CDs en la tolerancia central y periférica.**

Las CDs son importantes en la inducción y mantenimiento de tolerancia, tanto central como periférica. En la primera, las CDs de la médula del timo, y las células del epitelio tímico poseen una función crítica en la selección negativa, presentando antígenos propios a los timocitos. Como la tolerancia central no es totalmente eficiente, la periférica es necesaria a los fines de complementarla. La tolerancia periférica implica procesos como: 1) : la anergia clonal, donde la presentación del antígeno en el contexto de las moléculas del CMH induce una eficiente estimulación del RcT (señal 1), pero en ausencia de una co-estimulación suficiente (señal 2) de la CDs, producirá la inhibición de las funciones efectoras, y 2) : LT-reg con actividad supresora, generadas en el timo (LT-reg; CD4+CD25+Foxp3+) o en la periferia inducidas por las CDs tolerogénicas.

#### **El otro comportamiento de las CDs.**

Las CDi residentes en los tejidos periféricos migran hacia los ganglios linfáticos en ausencia de inflamación; estas células se presentan en forma inmadura, semi-madura o en estado estacionario. Las CD, semi-madura posee niveles reducidos de CD40, de CD80 y de CD86, una capacidad limitada de IL-12 y un aumento de IL-10. La presentación antigénica por parte de estas CDs conduce al silenciamiento del clon activado (anergia clonal). Las CDs semi-maduras inducen la expresión de las moléculas inhibitorias PD-1 (programmed-death-1) y CTLA-4 (cytotoxic-T-lymphocyte associated-antigen-4) para promover tolerancia periférica en los LT-CD8.

Se acepta que la dosis de Ag, el linaje de las CDs, su estado de maduración y la estimulación de las CDs por derivados de patógenos y/o citoquinas, determinará si la respuesta de los LT será inmunogénica o tolerogénica. Otras CDs son las tolerogénicas (CDT), que en diferentes estadios de maduración y activación inhiben la respuesta inmune hacia perfiles inflamatorios, y facilitan la proliferación de LT-reg naturales o LT-reg inducibles CD4+CD25+Foxp3+ (iTreg), de los LTh3 productores de TGF- $\beta$  a nivel de mucosas y de las células LT-r1 o T-regulatorias relevantes en auto-inmunidad, cáncer e infecciones, productoras de IL-10.

Esta citoquina disminuye la expresión de las moléculas co-estimuladoras y de citoquinas pro-inflamatorias en la CPA, e inhibe a la IL-2 y al TNF- $\alpha$  en los LTCD4. Las CD tolerogénicas inducen tolerancia periférica por LT-reg, a través del TGF- $\beta$ , por el contacto célula-célula o por ambos. Tanto las T-reg como el tumor, liberan IL-10, TGF- $\beta$ , y expresanIDO (indolamina 2,3-dioxigenada), generando aun más CDs tolerogénicas, que si no poseen moléculas coestimuladoras o expresan niveles del ligando PD-1 favorecen la diferenciación de iT-reg. Las CDs al endocitar cuerpos apoptóticos inducen niveles de TGF- $\beta$ , que



favorecen la diferenciación de i-Treg.

Las células tumorales expresan factores que estimulan a las CD4 a producir TGF- $\beta$ , y así, desvían su maduración y provocan la proliferación de las T-reg. Las quimioquinas de las células tumorales reclutan T-reg dentro del lecho tumoral.

Las T-reg representan el 5/10% de los LTCD4 en roedores, y expresan moléculas de superficie asociadas con la activación/memoria (CD25, CD45R-blow, CD62L, CD103, CTLA-4 y GITR), así como el factor de transcripción Foxp3. En condiciones normales, las T-reg están en estado de anergia, ya que no proliferan o producen IL-2 en respuesta al estímulo de los LT. Esta anergia puede ser eludida por la adición de altas dosis de IL-2, anti-CD28 o expuestas a las CD4 maduras, que pueden inhibir la función inhibitoria de las T-reg.

En los humanos, los LT-reg se acumulan en el tumor, ganglio drenante y sangre, al igual que en los tumores murinos. Los LT-reg impiden una respuesta por LT efectoras por citoquinas supresoras, como la IL-10 y el TGF- $\beta$  o por contacto célula-célula a través del CTLA-4.

Este es el receptor inhibitorio principal de los LT activados y se une a B7.1 y B7.2 (CD80 y CD86) en CD4 con mayor afinidad que su receptor de activación, CD28. Por lo tanto, las T-reg inhiben la expresión de las moléculas CD80 y CD86 vía CTLA-4 y/o LFA-1 (lymphocyte-function-associated-antigen-1).

Por la vía del CTLA-4, las T-reg aumentan la actividad de la enzima IDO en las CD4.

La disminución del triptófano, causa en los LT CD4 un aumento en la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , y consecuente supresión de la respuesta inmune.

#### **Los macrófagos (M):**

Actúan como primera defensa, al detectar y eliminar partículas “extrañas” (microorganismos, macromoléculas tóxicas, células propias o tumorales dañadas o muertas) mediante fagocitosis o secreción de enzimas, citoquinas o producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Durante la RIA los M presentan antígenos a los LT en el contexto del CMH-I y/o CMH-II, y colaboran con la respuesta humoral en la eliminación de agentes extraños. Además, los M actúan en la reparación de heridas y resolución de la inflamación, reclutando otras células inflamatorias, remodelando la MEC y la angiogénesis.

#### **Como se diferencian los M:**

Se originan en células madre hematopoyéticas, y derivan de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos por citoquinas y quimioquinas <sup>[14]</sup>. A pesar de ello, un 5 % de los M derivan de la división local de mononucleares en los tejidos <sup>[42]</sup>. Las citoquinas que determinan su supervivencia, diferenciación y quimiotaxis son el GM-CSF, el M-CSF y la IL-3. El M-CSF es sintetizado por los M, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y células del estroma, y su concentración en el suero oscila entre de 3-8 ng/ml. Su producción es inducida por la activación de células hematopoyéticas y fibroblastos por los GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$ . La síntesis del M-CSF es regulada de manera tejido-específica, y sus niveles son elevados en estados de inmunosupresión (embarazo, tumores), siendo importante en la tolerancia materna hacia el embrión <sup>[47]</sup>. El GM-CSF, es fundamental en el desarrollo mielóide, ya que los ratones M-CSF<sup>-/-</sup> exhiben una generación deficiente de M, mientras que los ratones GM-CSF<sup>-/-</sup> sólo muestran alterada la maduración de M alveolares. El receptor de M-CSF de alta afinidad (CSF-1R, M-CSFR, c-fms, CD115) se expresa en monocitos, CD, M y sus precursores.

El GM-CSF es producido por los LT, LB, M, Mc, eosinófilos, PMN y células endoteliales <sup>[43]</sup>. En condiciones normales, el GM-CSF tiene una concentración sérica de 20-100 pg./ml, y es producido por las células tumorales, requiriendo activación de las células productoras. Promueve la viabilidad, proliferación y maduración de los PMN, eosinófilos y M, y sus funciones dependen de su concentración. Sus efectos biológicos están mediados por un receptor que, a diferencia del receptor homo-dimérico del M-CSF (M-CSFR), está compuesto por una cadena  $\alpha$  de unión a GM-CSF, y una cadena  $\beta$  necesaria para la transducción de señales <sup>[51]</sup>.

### Los M generados en presencia de los GM-CSF y M-CSF:

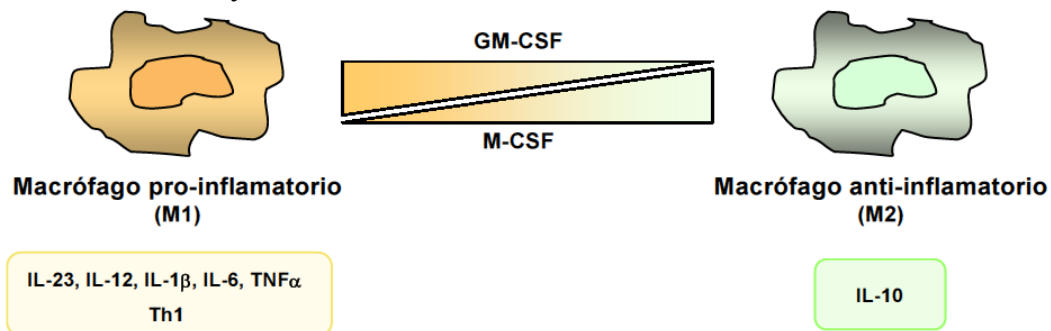
Los GM-CSF y M-CSF presentan una modulación cruzada de sus actividades funcionales. Mientras que el M-CSF aumenta la generación de los M en presencia de bajos niveles del GM-CSF, altas concentraciones de éste, impiden el desarrollo de los M mediado por el M-CSF, debido a la acción inhibitoria del GM-CSF sobre la expresión del M-CSFR. Aunque los M humanos derivados de monocitos (MDM), diferenciados en presencia de los GM-CSF o M-CSF *in vitro*, se consideran equivalentes a los M residentes en condiciones homeostáticas <sup>[9]</sup>, ambas citoquinas se usan en la generación *in vitro* de MDM, dando lugar a poblaciones fenotípica y funcionalmente diferentes. <sup>[14]</sup>

En presencia del GM-CSF se generan M, denominados M1, que producen citoquinas pro-inflamatorias (IL-23, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) en respuesta a Mycobacterium, y promueven inmunidad del tipo Th1 (pro-Th1).

Por otro lado, los inducidos por el M-CSF se llaman M2, y secretan IL-10, inhiben las respuestas Th1, e inducen tolerancia. Los M2 actúan como moduladores de la auto-inmunidad, pues inducen LT-reg e inhiben la diferenciación de LTh1 y LTh17. <sup>[58]</sup>

Así, los M1 y M2 juegan papeles opuestos durante la respuesta inmune, y son considerados como M pro- y anti-inflamatorios. (Fig. 13).

Igualmente, los GM-CSF y M-CSF se emplean para la generación “*in vitro*” de M a partir de precursores de la médula ósea del ratón, y sus propiedades pro- y anti-inflamatorias se ajustan a las de los M1 y M2 derivados de monocitos humanos <sup>[59, 60]</sup>.



**Fig. 13.-** Macrófagos diferenciados con GM-CSF y M-CSF. Esquema ilustrativo de los macrófagos generados en presencia de GM-CSF (M1 o pro-inflamatorios) o de M-CSF (M2 o anti-inflamatorios) y sus diferencias en la respuesta inmune.

### Las características fenotípicas y funcionales de los M1 y M2:

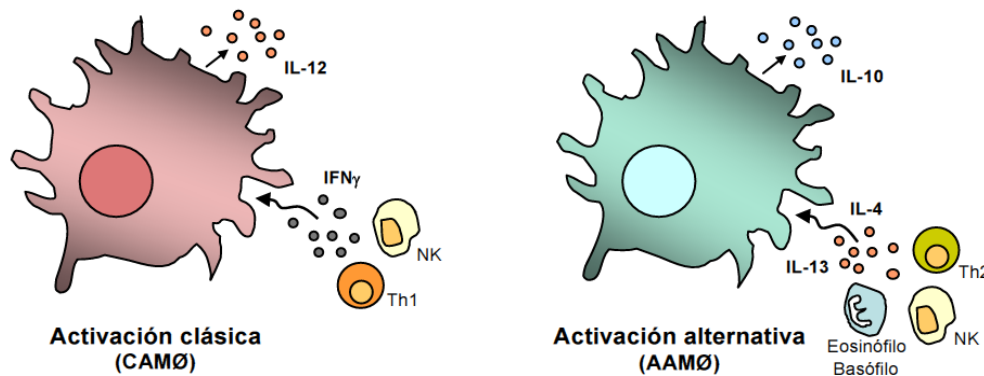
Se denomina activación clásica del M a la inducida por el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , o a ligandos de los receptores Toll (TLR) (CpG DNA, poli (I:C), LPS, péptido-glicano y HSP de 60 y 70 kDa). Los M activados clásicamente, o CAM $\emptyset$ , M1, son capaces de detonar mecanismos como la muerte de parásitos intracelulares, la lisis de células tumorales, la producción y secreción de las IL-1 $\beta$  e IL-6, los altos niveles de IL-12, IL-23, IL-18, TNF- $\alpha$ , CCL3 y CXL9, y los bajos niveles de IL-10 en respuesta al Mycobacterium, con fuerte acción del LTh1 y CXCL10, producción de ROS, generación de ON en ratas, cambios fago-lisosomales y aumento en la expresión del CMH-II y del CD86 y presentación antigénica al LTh1. (Fig. 14).

El IFN- $\gamma$  producido por los LTh1, LT-CD8+ y NKC, otorga a los M capacidad citotóxica, microbicida y anti-proliferativa. No hay una definición clara de “activación alternativa,” porque la IL-4 generaría un fenotipo de M activado olvidando a los inducidos por las IL-13 e IL10, los glucocorticoides y el TGF- $\beta$ , que algunos autores los consideran como “activadores alternativos”. *In vitro*, los efectos, de extensión y dirección (activantes o desactivantes), están influenciados por la estimulación (señales y concentraciones del tratamiento), la especie, el tejido, y el estado de diferenciación. Algunos atribuyen la desactivación a la IL-10 y al TGF- $\beta$ , pero otros creen que estas citoquinas no son sólo inhibitorias, pues el análisis de la expresión génica evidenció que poseen genes compatibles con el perfil alternativo.

Es importante notar que el IFN- $\gamma$  y la IL-4 son los agentes ejecutores de efectos antagonistas sobre los M: la expresión de los CD16, CD32 y CD64 es inducida por el IFN- $\gamma$ , pero inhibida por IL-4; la expresión del MMR receptor de manosa y la 15-lipooxigenasa es inducida por la IL-4, pero inhibida por el IFN- $\gamma$ .

La expresión y síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias como las IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ , son inhibidos por la IL-4, pero inducidos por el IFN- $\gamma$ .

Definiendo una nomenclatura para los “activados alternativamente”, M2, M $\phi$ 2, tipo II, (AAM $\phi$ ) se propone el uso de M2 como nombre genérico para las formas alternativas de activación que, además, comparten propiedades funcionales involucradas en respuestas tipo II, como inmuno-regulación y remodelación del tejido. Se propone denominar como M2a a la inducida por IL-4 e IL-13, M2b a la promovida por la exposición a complejos inmunes y agonistas de los TLRs y M2c a la estimulada por la IL-10 y los glucocorticoides. Esta clasificación no incluye el TGF- $\beta$  como activador alternativo, pero induciría el fenotipo M2c. No se sabe si un M al ser estimulado adquiere un fenotipo que conserva durante su vida funcional, caso en el cual existirían in vivo subpoblaciones de M con estados de activación definidos, o si su patrón de activación es errático por los estímulos que encuentre, lo que generaría un amplio rango de fenotipos no estables representantes de una continua activación.

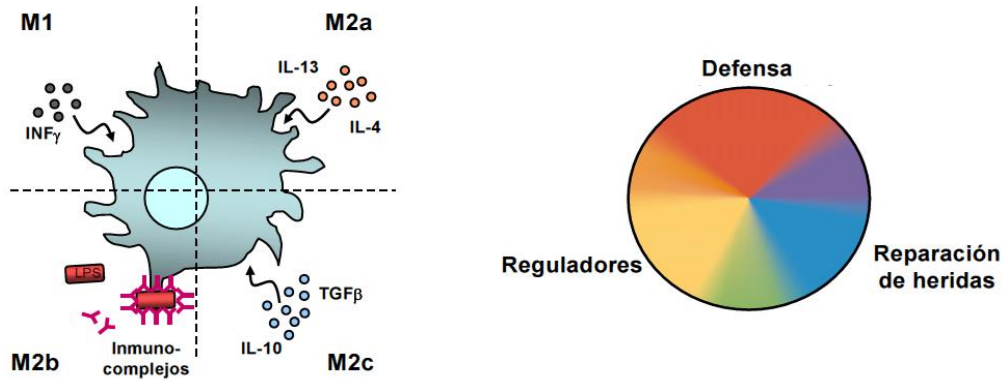


**Fig 14.-** Tipos de activación de los macrófagos. Representación esquemática de la activación mediante estimulación con IFN- $\gamma$  (activación clásica) o citoquinas Th2 como IL-4 e IL-13 (activación alternativa).

Las vivencias inflamatorias y citotóxicas de los M activados apoyaron la idea de que sólo las citoquinas Th1 promovían su activación, mientras que las del tipo Th2 las bloqueaban o desactivaban. Pero, además de inhibir respuestas Th1, las Th2 aumentan las funciones de presentación antigénica, reparación tisular y capacidad endocítica. Así, los que inhiben la generación y actividad de los CAM $\phi$  (IL-4, IL-13, IL-10 y el TGF- $\beta$ , glucocorticoides y la vitamina D3), e incluso las células apoptóticas, se responsabilizaron de una forma “alternativa” de activación (AAM $\phi$ , M2).

Estos, producen la IL-10 y el TGF  $\beta$ , y muy poca IL-12 bajo estimulación, y presentan funciones inmunosupresoras e inhiben la proliferación de LT. Las diferencias en las funciones de CAM $\phi$  y AAM $\phi$  se demostraron en ensayos in vitro, donde los AAM $\phi$  inducen proliferación celular y deposición de colágeno de fibroblastos, e inhiben la proliferación de LT inducida por mitógenos. Al mismo tiempo, los AAM $\phi$  contribuyen a la vascularización in vivo y exhiben actividad angiogénica in vitro, similar a la de MDCC maduras en presencia de la IL-10, el TGF- $\beta$ , y glucocorticoides.

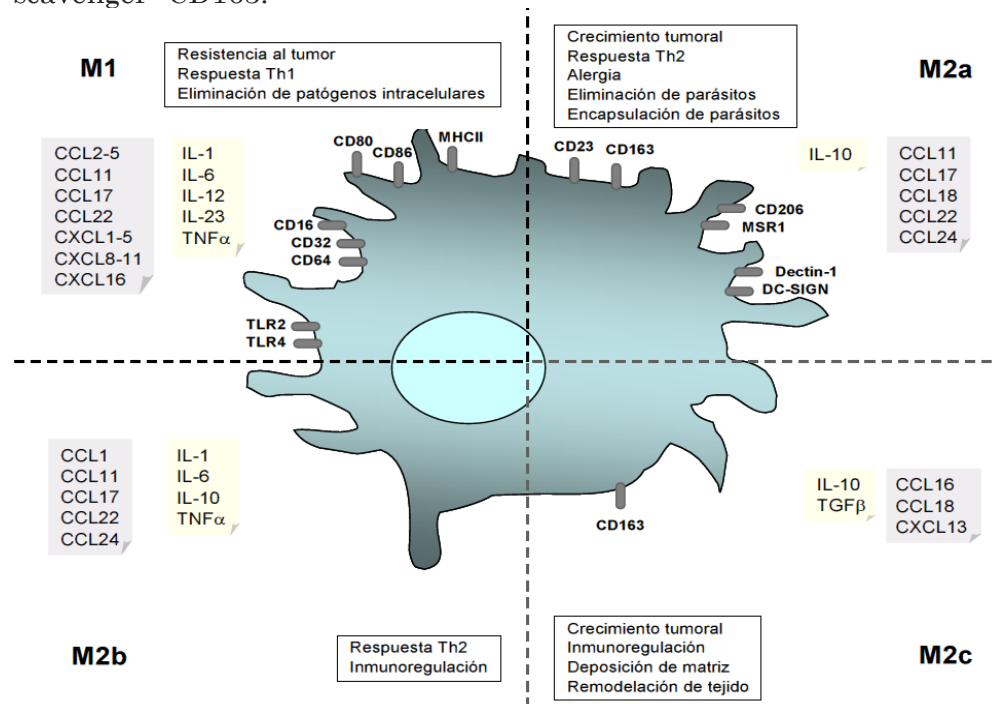
Los AAM $\phi$  activados por la IL-4 son esenciales en la eliminación y control de la infección por patógenos extra-celulares. La sigla AAM $\phi$  fue propuesta para identificar a los activados por las IL-4/IL-13, que sería una activación “no clásica.” (Fig. 15).



**Fig. 15.-** Propuestas de clasificación de los macrófagos activados. Los macrófagos polarizados se clasifican en función del estímulo de activación (izquierda) o de su función efectora primordial (derecha). Los tres colores primarios (rojo, amarillo, azul) representan las 3 poblaciones definidas, mientras que los colores secundarios representan macrófagos con funciones intermedias.

Los M2a y M2b exhiben niveles de expresión de moléculas de adhesión (CD11a, CD54, CD58) y co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) similares a los CAM $\emptyset$ , la activación alternativa en respuesta a las IL-4 e IL-13, con un repertorio de receptores fagocitarios característicos. Estos receptores dotan a los M2a de actividades endo-citotóxicas y fagocíticas, y son destacables: 1) el receptor de manosa (MR1, CD206), cuya señalización intracelular está asociada a la producción de IL-10, la expresión de IL-1Ra, y a la inhibición de la producción de IL-12 en respuesta a la endotoxina; 2) el receptor “scavenger”-1 (MSR1, CD204), con un papel en el reconocimiento y eliminación de lipoproteínas; 3) el receptor de  $\beta$ -glucanos-Dectin-1, con especificidad por glucanos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6, de hongos y bacterias, y que colabora con el TLR2 en la respuesta anti-fúngica; y 4) DC-SIGN, con un amplio espectro de reconocimiento de patógenos. (Fig. 16).

Otros marcadores de la activación alternativa son el DCIR y el DCL-1, el CD23 y el receptor “scavenger” CD163.



**Fig. 16.-** Características fenotípicas y funcionales de macrófagos polarizados en función del estímulo de activación. Se representan las principales características fenotípicas (secreción de quimioquinas (cuadro gris) y citoquinas (cuadro más claro), y expresión de receptores de

membrana), así como las características funcionales que diferencian los diversos estadios de polarización de los macrófagos.

La expresión de genes que controlan el metabolismo celular se utiliza para discernir entre los diferentes tipos de activación. Así, la expresión de genes que participan en el metabolismo de la arginina, diferencia CAMØ y AAMØ en ratón, pero no en los humanos. La arginasa 1 (Arg1) es un marcador prototípico de activación alternativa, pues su expresión es dependiente de IL-4/IL-13, mientras que la óxido nítrico sintetasa (iNOS) es inducida por el IFN- $\gamma$ . Los CAMØ metabolizan arginina vía iNOS, generando óxido nítrico, que es microbicida. La expresión de la Arg1 permite a los AAMØ producir poliaminas y prolina, esenciales para la proliferación celular y la producción de colágeno. Otros marcadores de AAMØ en ratón, sin homólogos en humanos, son los miembros de la familia quitinasa Ym1 y Ym2 (Chi-3l3 y Chi-3l4), y Fizz-1, involucrado en el metabolismo de los lípidos. [99]

La polarización hacia un fenotipo alternativo asocia un aumento de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, implicados en la captación y oxidación de los ácidos grasos. [100]. Así, Fizz-1, Stab-1 y la lipoxigenasa ALOX-15 poseen mayor expresión en los AAMØ. [77, 93]. A diferencia de AAMØ, los CAMØ sobre-expresan genes involucrados en el metabolismo del colesterol como ABCA-1 y a poli-poproteínas L (APOL1-3,6), involucrados en su transporte y en el desarrollo de aterosclerosis.

Los genes que codifican para las enzimas del metabolismo lipídico (eicosanoides, leucotrienos, esfingosina y ceramida) se expresan diferente entre CAMØ y AAMØ. La expresión de la COX-2 está asociada con el metabolismo del ácido araquidónico en CAMØ, mientras que las esfingosina y ceramida-quinasas, que catalizan el equilibrio ceramida-esfingosina, están expresadas en CAMØ y AAMØ [93].

El receptor PPAR- $\gamma$ , y uno de sus genes diana (FABP-4), se incluyen en los genes con mayor expresión en los AAMØ, ya que IL-4 es un inductor de este receptor y de sus activadores metabólicos. Los ratones deficientes en PPAR- $\gamma$  tienen disminuidos los niveles del ARNm y la actividad de la Arg1, no presentan M con fenotipo alternativo y, por su papel en el metabolismo graso, son más obesos [103]. PPAR- $\gamma$  es un regulador negativo de la activación clásica del M [104] y regula las respuestas dependientes de la IL-4, para mantener el fenotipo alternativo en los M activados [103]. La activación de los factores NF $\kappa$ B, STAT-1 y AP-1 son esenciales para la polarización clásica del M [105]. Estímulos inflamatorios como LPS, activan rutas de señalización dependientes del MyD88, que llevan a la activación de NF $\kappa$ B y AP-1, y rutas independientes de este adaptador intracelular, con la activación de IRF3 y STAT-1 [106]. Por el contrario, la IL-10 liberada por los AAMØ inhibe la activación del NF $\kappa$ B y mantiene su fenotipo inmunosupresor [107-109]. De hecho, la pérdida de expresión de IRF3, STAT-1 y NF $\kappa$ B en los M de médula ósea del ratón está asociada con la supresión de la polarización pro-inflamatoria [110].

Los M2, son anti-inflamatorios, inhiben al IFN- $\gamma$ , antagonizan sus respuestas, incluida la activación del M1, y son inducidos por otros mediadores.

#### **Los M2a.**

Son promovidos por las IL-4 e IL-13, que inducen fenotipos solapados con una estructura tridimensional similar, y sus receptores comparten la cadena IL-4R $\alpha$ . La unión de las IL-4 e IL-13 causa la activación de JAK1 y Tyk2, la fosforilación de tirosinas en la cadena IL-4R $\alpha$ , el reclutamiento del STAT-6, su fosforilación, dimerización, translocación al núcleo y activación transcripcional. El STAT-6 secuestra moléculas co-activadoras de STAT-1 y NF $\kappa$ B, suprimiendo la activación de genes inducidos por LPS e IFN- $\gamma$ . Hay diferencias en la respuesta a las IL-4 e IL-13 acorde al grado de diferenciación de los mononucleares, pues la configuración de sus receptores varía en los heterodímeros que forman la cadena del IL-4R $\alpha$  con las cadenas  $\gamma$  y del IL-13R $\alpha$ 1, que afecta la activación de STAT-6.

Las IL-4 e IL-13 activan la vía de señalización del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2) y disminuyen la expresión de los CD14, CD64, CD32 y CD16, aumentan el CD23, incrementan la expresión de las subunidades de integrinas y receptores de complemento



CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD49e (VLA5), de la amino-peptidasa N (CD13) y del CMH-II, para la presentación antigénica. La IL-13 regula la expresión de los genes que codifican a CD1-b, -c, -e y una lectina tipo C (CLEC-SF6), lo que puede favorecer la presentación antigénica de lípidos y glicolípidos. Las IL-4 e IL-13 estimulan la expresión en membrana y la actividad de receptores no opsónicos, como el MMR, y el receptor de  $\beta$ -glucano, dectina-1, pero regulan negativamente la expresión de CD163 en monocitos, favoreciendo el reconocimiento de carbohidratos de micro-organismos y disminuyendo el de cuerpos apoptóticos. Ambas citoquinas aumentan la expresión in vitro de las lectinas 1 y 2 tipo C de galactosa (mMGL1 y mMGL2) en M peritoneales inducidos con tioglicolato. En monocitos humanos, IL-4 regula la expresión de lectinas hMGL, lo que favorece el reconocimiento de glicoproteínas galactosiladas en las células cancerosas y de compuestos glicosilados de la superficie de helmintos.

En los M2a hay una fuerte regulación del sistema IL-1, lo que contrarresta sus acciones pro-inflamatorias. Las IL-4 e IL-13 incrementan la expresión del receptor IL-1R-I y del pseudo-receptor, IL-1R-II, inducen la producción del receptor IL-1ra e inhiben la producción de IL-1, como efecto de la regulación negativa sobre la caspasa-1 y la MMP9, enzimas que procesan la pro-IL-1 $\beta$ . La producción de las IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p35, IL-12p40, MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, PGE2, IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , promovidas por los LPS es inhibida por las IL-4 e IL-13.

El pre-tratamiento de mononucleares de sangre periférica con las IL-4 e IL-13 aumenta la síntesis de IL-12p35, IL12p40 y de TNF- $\alpha$ , por la estimulación con LPS o *Staphylococcus aureus*. Las IL-4 e IL-13 incrementan la producción de CCL17, CCL22, CCL18 y los receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2 en monocitos <sup>(113)</sup>, e inducen la producción de CCL24 en M, pero la inhiben en monocitos. La IL-4, más no la IL-13, regula la expresión de CCL2 en ratas, y la de CCL13 en monocitos y M humanos e inhibe las quimioquinas de los M1, como las CXCL10, CCL5, CXCL9, CCL3 y CCL4. <sup>(104)</sup>.

Este sub-grupo de quimioquinas se asocia con respuestas Th2, con la remodelación y reparación tisular, alergia, resistencia a los helmintos y la progresión tumoral.

La IL-4 inactiva el estallido respiratorio, estimula al activador tisular del plasminógeno, suprime la función pro-coagulante, y limita la formación de fibrina. Las IL-4 e IL-13 modulan a la 15-lipoxigenasa, inhiben la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS2), la transcripción de la IL-2, como inhibición indirecta de la proliferación de LT por la IL-4 <sup>(123,125)</sup>.

También estimulan la expresión de Arg1 in vitro, anulando el sustrato de NOS2 e inhibiendo la liberación de ON. Los productores de Arg1 actúan en procesos de reparación tisular, fibrogénicos, en la síntesis del colágeno y son anti-inflamatorios por la producción de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) que inhiben a la NOS2 y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en monocitos humanos. <sup>(128,129,131-134)</sup>.

La regulación del balance entre los NOS2-Arg1, sugiere que los niveles de ON y del Arg1 en poblaciones de M reflejaría su estado de activación <sup>(135)</sup> y aunque esta dicotomía sirve en ratas, en humanos las IL-4 e IL-13 no inducen al Arg1, ni de la de su homólogo Ym1, por eso estos marcadores no se usan para la diferenciar M1 y M2a. La IL-21 y su receptor (IL21R) son amplificadores de los M2a. El IL-21R posee una alta homología con el IL-4R, y los animales deficientes en IL21R e infectados con *Schistosoma mansoni* y *Nippostrongylus brasiliensis* poseen una leve inflamación granulomatosa y fibrosis hepática, con bajas IL-4 e IL-3.

### **Los M2b.**

Denominados tipo II, se generan por la exposición a complejos inmunes, agonistas del CD64 opsonizado con IgG con eritrocitos, OVA y *Haemophilus influenzae* muerta por calor, como primera señal, y a ligandos de los TLRs, como los LPS o el ácido lipoteicoico (LTA), y del CD40 (aCD40) ó CD44 (como el ácido hialurónico de bajo peso molecular), como segunda señal estimuladora que produce citoquinas.

Los M2b son muy diferentes a los M2a y M2c, por la expresión de IL-10 y poca IL-12, los altos niveles del TNF- $\alpha$ , las IL-1 $\beta$  e IL-6, no expresan Arg1 y, sólo expresan la

quimioquina, CCL1, que recluta LT<sup>-</sup> reg y eosinófilos. Expresan los CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80 y CD86, como los M2a y M1, y moléculas del CMH- II. Promueven la diferenciación Th2, exacerbando patologías como el asma, las infecciones por helmintos, la muerte y encapsulación de parásitos, y el cambio de isotipo de IgG → IgG1. Los M2b rescatan a los ratones de la endotoxemia por los LPS, por la IL-10. En ratas, se vio similitud mayor entre los M2b y los M1, que entre los M2a y M2b, aunque los patrones de IL-12 e IL-10 fueran diferentes.

Los M2b y los M2a producen mucho ON y escaso Arg1, regulan al CD86, y son CPA eficientes. Se caracterizaron 2 marcadores bioquímicos que se usan para identificar a los M2b en el tejido: la esfingosina-quinasa 1 (SPHK1), que cataliza a la esfingosina-1-fosfato que regula flujos de Ca<sup>2+</sup>, y la molécula co-estimuladora LIGHT, o TNFSF14, que activa a los LT a través de los receptores TR2 y TR6.

### **Los M2c.**

Aunque la IL-10, el TGF-β y los glucocorticoides son inductores del M2c, no tienen igual señalización intracelular y regulación génica. La IL-10 inhibe a las citoquinas pro-inflamatorias, a la liberación del ON y del ROS, y a las actividades anti-microbianas. Los corticoides frenan la síntesis de las IL-6, IL-1β, TNF-α y PGE-2, y sinergizan con la IL-4. El TGF-β es dual en la modulación del M2c, ya que actúa como activador pro-inflamatorio estimulando la transcripción de los PDGF, FGFβ, IL-6, TNF-α e IL-1β<sup>(155-160)</sup>, mientras que en otras inhibe la producción del TNF-α, IL-1α, IL-1β y GM-CSF<sup>(33,161)</sup>, y también antagoniza la producción de ROS y RNIS.

Esto depende de la diferenciación del mononuclear; en estadios tempranos de la inflamación, el TGF-β actúa como pro-inflamatorio por la activación de monocitos no activados; en la resolución de la inflamación predominan sus acciones anti-inflamatorias debido a que los monocitos diferenciados a M regulan negativamente la expresión del TGFβ-R y disminuyen su sensibilidad al TGF-β.

La IL-10 induce la expresión de quimioquinas como las CCL2<sup>(164)</sup>, CCL12<sup>(165)</sup>, CCL18<sup>(166)</sup>, CCL16<sup>(167)</sup>, en monocitos y M humanos, y con los LPS la de la CXCL13 en los monocitos. Regula la producción de los receptores de las quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5.

La IL-10 inhibe la expresión de las CCL22<sup>(110)</sup>, CXCL8, y, como la IL-4, la de las CXCL10, CCL5, CXCL9, CCL3 y CCL4, que inducen los TLRs y el IFN-γ.

Los glucocorticoides suprimen a la CXCL10, en los M tratados con IFN-γ a través de la inhibición del STAT-1,<sup>(172)</sup> modulan negativamente la expresión de las CCL13, CCL17 y CCL18, aunque sinergizan con la IL-4.

La IL-10, el TGF-β y los glucocorticoides inhiben a la CCL2 inducida por los LPS y la IL-1β. El TGF-β inhibe la liberación de la CCL3, por regulación negativa de la c-Jun/AP-1<sup>(155,175)</sup>, pero induce una respuesta quimio-atractiva en los monocitos, promoviendo su reclutamiento a los sitios de inflamación. La IL-10 y los glucocorticoides regulan negativamente la expresión del CMH-II, el CD80 y el CD86, atenuando la presentación antigénica. No estimula la expresión ni del CD32 ni del CD16, si del CD64, y de la regulación negativa de los 3 RFcy promovida por IL-4.

El TGF-β induce la expresión del CD16, lo que permite el reconocimiento de la IgG unida, favoreciendo la fagocitosis y remoción de restos celulares.

Los glucocorticoides, al contrario de la IL-4, inhiben la expresión del CD23 y del activador tisular del plasminógeno, que induce la deposición de la fibrina en la inflamación; sinergizan con esta citoquina la regulación de la estabilina-1 y de su receptor SI-CLP. El TGF-β incrementa las integrinas como LFA-1, el ligando endotelial del ICAM-1, receptores α3β1 que unen el monocito a la fibronectina, colágeno y laminina, y del receptor de fibronectina α5β1.

El TGF-β y la IL-10 regulan la expresión del IL-3R en los monocitos humanos. La dexametasona incrementa la expresión y actividad del MMR, pero la IL-10 tiene efectos variables sobre éste receptor y reduce su endocitosis. Por otro lado, ambos regulan positivamente la expresión del CD163, más en M que en monocitos, y la del receptor hMARCO, pero disminuyen la expresión y la actividad de la dectina-1; el TGF-β inhibe la

expresión del CD163 mientras que induce la de la dectina-1.

La IL-10 inhibe la expresión de los IL-1RI y IL-1RII en monocitos estimulados con las IL-4 e IL-13 e induce la del IL-1Ra, que antagoniza la dexametasona.

El TGF- $\beta$  induce la síntesis y expresión de la IL-1 $\beta$  y luego la del IL-1Ra en monocitos humanos. Además de la liberación del IL-1Ra, la actividad anti-inflamatoria de la IL-10 aumenta por la liberación de receptores del TNF- $\alpha$  como el TNF-R2. La IL-10 incrementa los niveles totales de los Arg1 y 2 en mononucleares. El TGF- $\beta$  induce la síntesis y secreción de las MMP2 y MMP9, que disuelven la membrana vascular basal, que posee colágeno tipo IV, fibronectina y laminina. La fagocitosis de las células apoptóticas genera M2c. <sup>(203)</sup>.

La unión y/o ingestión de PMN apoptóticos inhibe la producción de las IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-10, GM-CSF y TNF- $\beta$ , e incrementa los niveles de los TGF- $\beta$ 1, PGE2 y del PAF en los MDM humanos estimulados con LPS, involucrados en la inhibición de la producción de citoquinas. <sup>(161)</sup>. El TGF- $\beta$ 1 liberado por M, que fagocitaron células apoptóticas tiene efectos anti-inflamatorios en peritoneo y pulmones <sup>(206)</sup>. Los efectos supresores de los glucocorticoides, las IL-10, IL-4 y IL-13, en la expresión de citoquinas Th1, la inflamación y la activación inmune se explican por la regulación negativa de los NF- $\kappa$ B y STAT-1 <sup>(56,177)</sup>. La inhibición del NF- $\kappa$ B se explica por la activación de la leucina y glucocorticoides que suprimen funciones del AP-1 e inhiben la expresión de TLRs <sup>(177)</sup>.

### **Los M asociados a los tumores (MAT) :**

Son un ejemplo de la plasticidad de la activación de los M. En los tumores hay una infiltración de PMN, cuyo estado de maduración determina su influencia sobre el tumor. Los M son mayoritarios en el infiltrado tumoral <sup>[112]</sup>, y son un ejemplo de activación alternativa patológica de los M. Los MAT provienen de monocitos de sangre periférica reclutados hacia el tumor, por factores como los M-CSF, MCP-1, VEGF y Angiopoietina-2. <sup>[113-117]</sup> **(Fig. 17)**.

La diferenciación intra-tumoral da lugar a M con niveles reducidos de receptores de quimioquinas, lo que evita su migración desde los tejidos tumorales. Los MAT regulan pasos en el desarrollo del tumor, y su abundancia se correlaciona con la progresión tumoral, remodelación de la MEC, la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas, e inhibición de la RIA (inmunosupresión). <sup>[117]</sup>.

La elevada densidad de M en las metástasis, y ganglios linfoides regionales, favorece el crecimiento del tumor. <sup>[113]</sup>. El fenotipo y función de los MAT está dado por factores micro-ambientales del tumor <sup>[118, 119]</sup> **(Fig 7)**. Citoquinas y factores de crecimiento del tumor (los IL-10, TGF- $\beta$ , M-CSF, VEGF, MCP-1) aumentan la generación de M y reducen la diferenciación de las CD y, determinan los niveles de CPA en el tumor y en los tejidos cercanos. Junto con el TGF- $\beta$ , el M-CSF es el responsable del ambiente inmunosupresor intra-tumoral <sup>[111]</sup>.

En el carcinoma mamario espontáneo, los ratones M-CSF-/- presentan una progresión tumoral más lenta que los ratones normales <sup>[120]</sup>. La IL-10 del tumor induce en los MAT funciones asociadas a los M2. Por ello, los MAT sintetizan pocas moléculas anti-tumorales (los TNF $\alpha$ , IL-1, ROS, NO) y citoquinas (las IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6), y no activan al NF $\kappa$ B. <sup>[111]</sup>. La producción de mediadores inmunosupresores (las prostaglandinas, IL-10 y TGF- $\beta$ ) permite a los MAT inducir la diferenciación de LT-reg, que suprimen la actividad de los LT efectores, favoreciendo el crecimiento tumoral. La actividad angiogénica del tumor es favorecida por la acumulación de MAT en regiones de hipoxia poco vascularizadas, a las que se adaptan por los factores HIF-1 y HIF-2 <sup>[125]</sup>.

Los MAT promueven angiogénesis por los factores de crecimiento (VEGF, FGF y HGF), metalo-proteasas (MMP-9) y el activador de plasminógeno (uPA), que degradan la MEC, facilitando la migración e invasión de las células tumorales. **(Fig. 7)**.

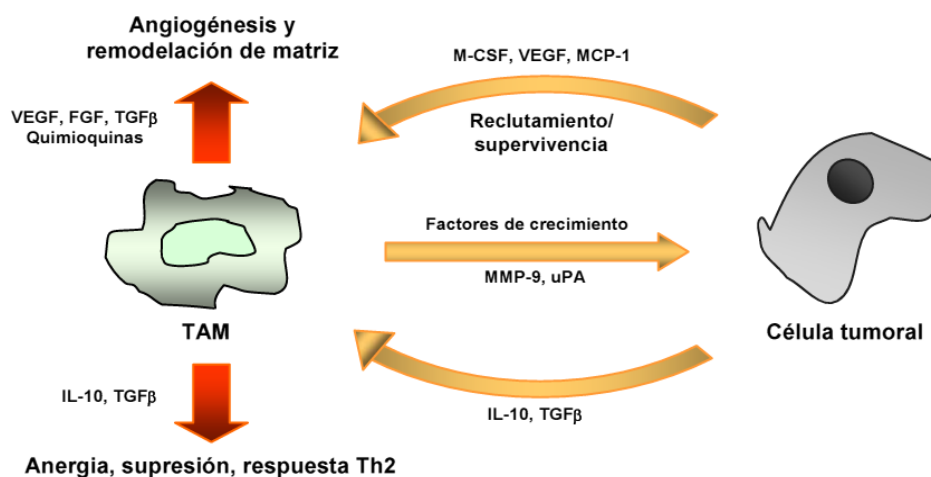
Los marcadores de los M2 se observan en los MAT procedentes del fibrosarcoma y del linfoma con el fenotipo alternativo de estos M. <sup>[127, 128]</sup>. En ese mismo modelo se observan también altos niveles de quimioquinas Th1, como las CCL5, CXCL9 y CXCL10, lo que sugiere un cambio de las propiedades de los M2 <sup>[127]</sup>. Los MAT son M con fenotipo anti-



inflamatorio por sus citoquinas y la deficiente activación del NFκB, contribuyen a la angiogénesis y crecimiento tumoral por la secreción de mediadores de los M1 y reguladores del NFκB, como los TNFα, IL-1β y MMP-9.

En un estado tumoral avanzado, los MAT de ratón expresan NOS2 y Arg1 que, implicados en el metabolismo de la arginina, producen liberación de NO y aumento en la producción de ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y RNS (ONOO<sup>-</sup>), deteniendo la proliferación y, provocando la muerte del LT. [116]. Los MAT expresan características pro-inflamatorias y supresoras, con un equilibrio en su polarización fenotípica M1 y M2.

Esta versatilidad de los TAM es debida al dinamismo del micro-ambiente tumoral, y está regulada por mecanismos moleculares, como la modulación del NFκB o las vías de señalización activadas por la hipoxia. En los casos que la presencia de MAT se correlaciona con un buen pronóstico del tumor, el GM-CSF podría ser responsable de la adquisición de un fenotipo citotóxico por los M intra-tumorales. [130].



**Fig. 17.-** Interacción entre macrófagos y células tumorales. Las células tumorales secretan factores que atraen y determinan la polarización de los macrófagos en los tumores. A su vez, los MAT producen factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la remodelación del tejido, y contribuyen a la progresión y diseminación del tumor.

### Los linfocitos “natural killer” o NKC :

Los linfocitos asesinos o citolíticos naturales o LGL (linfocitos grandes granulares), son una subpoblación que destruyen a las células infectadas por virus y patógenos intracelulares, y que ya no expresan moléculas del CMH-I. Derivan de precursores de la médula ósea, pero no son ni LB ni LT, pues no tienen receptores específicos ni manifiestan mutación somática. Se hallan en la sangre circulante y en el bazo, constituyendo entre un 5 a un 20% de los mononucleares presentes.

Su activación está regulada por un equilibrio entre las señales emitidas por los receptores activadores e inhibidores. Los primeros, de discutible estructura, pero relacionados en la transmisión de señales con los ITAM (ricos en tirosina en las colas citoplasmáticas) se expresan en muchas células y en sustancias microbianas. Si ambos receptores están ocupados por su ligando, predomina la acción de los inhibidores y la NKC no se activa, lo cual evita la destrucción de células normales del huésped.

Los segundos vinculados con los ITIM, fosforilan los residuos de tirosina y se unen a la tirosina-fosfatasa (SHP-1), que a su vez, des-fosforilan a intermediarios de señalización de las vías de activación.

Participan en un fenómeno de defensa inmunológica que aúna las RIC y RIA, como lo es, la ADCC o citotoxicidad celular anticuerpo dependiente, ya que posee la habilidad de reconocer al receptor CD16 o para el Fcγ-IIIa de baja afinidad para los fragmentos Fc de las

IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, que se hallen en la membrana del patógeno.

Las NKC son estimuladas por las IL-12, IL-15 e IL-18. La IL-12 de origen M es una inductora de la síntesis del INF- $\gamma$ , y por ende de la actividad de la NKC, a la que se suma el efecto de la IL-18, potenciadora de la IL-12.

La IL-15, estimula el crecimiento de la NKC, como se demostró en murinos carentes del gen respectivo, y con un número escaso de NKC. La citólisis por la NKC es similar a la de los LTCD8<sup>+</sup>; así, los gránulos citoplasmáticos con perforinas, producen poros en las membranas de las células diana, y las granzimas, o complejos enzimáticos de alto peso molecular, penetran por esos poros e inducen la rápida apoptosis de la célula blanco. Así ejercen su agresividad contra células infectadas por virus y/o bacterias intracelulares causantes de enfermedades humanas.

Las NKC y los LTCD8<sup>+</sup> inducen la muerte por apoptosis con 2 mecanismos. En el primero, o mecanismo secretorio, las células citotóxicas reconocen y movilizan sus gránulos secretorios hacia las células blanco. Estos gránulos con la granzima B, una serino-proteasa capaz de activar caspasas y la perforina, una proteína desestabilizante de membranas. <sup>(13)</sup> En los gránulos, la granzima B forma un complejo con la perforina y una tercera proteína denominada serglicina que actúa como proteína transportadora. Este complejo se libera en la zona de contacto entre las 2 células donde es endocitado por la célula blanco, por el receptor de manosa 3-fosfato (MPR).

La internalización forma una vacuola de pH ácido que activa a la perforina, que desestabiliza la membrana de la vacuola endocítica, permitiendo que la granzima B acceda al citosol activando al sistema de caspasas que induce la muerte por apoptosis <sup>(15)</sup>.

En el segundo proceso, o no secretorio participa el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el ligando de Fas (Fas-L), y en forma secundaria en las NKC, TRAIL. <sup>(16)</sup> Una vez activadas, las células citotóxicas comienzan a expresar Fas-L en su superficie, lo que les permite unirse a las células que expresen su receptor CD95 (Fas). La interacción entre Fas y Fas-L induce la trimerización de Fas en la célula blanco promoviendo el reclutamiento de proteínas al dominio de muerte de Fas, con una cascada de caspasas que involucra a la caspasa 8 y conduce a la apoptosis de la célula blanco.

Las NKC y los LT-CD8<sup>+</sup> son los efectores más eficientes en la batalla contra los tumores. Las NKC no sólo son citotóxicas contra los tumores, sino que, por las citoquinas y el diálogo cruzado con las CDs, son capaces de regular la RIA, cuali y cuantitativamente. <sup>(17, 18)</sup>

Además de la IL-15, la IL-7, el SCF (stem-cell factor) y el flt3-L (ligando de flt3) juegan un papel relevante en su maduración. <sup>(19, 20)</sup> Ella puede ocurrir en ausencia de un timo funcional tanto en humanos como en ratones. Las NKC comparten un precursor común con los LT (diferente del de los LB y granulocitos/M), que se diferencia a un linaje T o NK por el microambiente. <sup>(22)</sup>

Las NKC fueron descritas por lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresaban moléculas del CMH-I. Así nació la hipótesis del “missing-self”, que proponía que las NKC monitoreaban los niveles de expresión del CMH-I sobre la célula, y destruían a aquéllas que habían dejado de expresar niveles normales de clase-I, generalmente células tumorales o infectadas con virus. Se las asoció con el fenómeno de vigilancia inmunológica, pues el reconocimiento de células con niveles bajos o nulos del CMH-I, implicaba la existencia de receptores/activadores de la citotoxicidad que disparasen su actividad biológica.

Las moléculas del CMH-I no son siempre necesarias para proteger de la lisis de las NKC. Estas son incapaces de rechazar tejidos no hematopoyéticos deficientes en moléculas del CMH-I, e in vitro no pueden lisar fibroblastos de ratones deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina que no expresan CMH-I. <sup>(23)</sup> La inhibición de la unión del CMH-I no es siempre suficiente para prevenir la citotoxicidad por parte de las NKC.

Algunas células infectadas con virus que expresan CMH-I en la superficie son lisadas eficientemente por las NKC autólogas. Además, NKC activadas con IL-2 aumentan su actividad lítica comparada con NKC no estimuladas, y lisan blancos resistentes.

La unión de receptores/activadores a moléculas de membrana de células blanco no solo

desencadena la citotoxicidad sino que promueve la producción de citoquinas, la migración de las NKC, su activación y proliferación. Cada NKC expresa su propio repertorio de receptores/activadores e inhibidores (entre 3 y 4 de cada tipo) de manera que la citotoxicidad se encuentra regulada por un balance de señales provenientes de receptores inhibidores que interactúan con el CMH-I y de receptores activadores que reconocen moléculas relacionadas con el CMH-I en las células blanco.

El papel de las NKC como “citotóxicas naturales” está siendo revisado, pues hay NKC en la sangre periférica fenotípicamente maduras, pero con baja actividad citotóxica contra células blanco susceptibles. Las NKC poseen distintos pasos de activación, regulados por receptores y citoquinas para ser citotóxicas para las células blanco, que no son totalmente conocidas. Evidencias recientes señalan que las CD8 y/o los monocitos y M serían los responsables de tal activación o de una interacción bidireccional que resulta en la maduración, activación o apoptosis de las CD8, dependiendo del estado de activación de ambos tipos celulares. Este reconocimiento es mediado por el receptor activador NKp30 en la NKC <sup>(32)</sup>.

La interacción in vivo entre CD8 y NKC, es importante en la respuesta inmune eficiente contra células infectadas por virus y células tumorales. Así, las CD8 adquieren capacidad de presentadoras de antígeno profesionales (CPAs que expresan las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86) pues las NKC promueven su maduración. Las NKC se convierten en una fuente de IFN- $\gamma$  necesaria para generar una respuesta del perfil Th1.

Esta diferenciación es iniciada por la IL-12 de las CD8 maduras y requiere del factor de transcripción T-bet <sup>(36)</sup>. El IFN- $\gamma$  polariza hacia el perfil Th1, y por un lado, aumenta la IL-12 por CD8, y por otro, sinergiza las señales traducidas desde el RcT para maximizar la expresión de T-bet, y del receptor de IL-12 en LT naive.

Eric Vivier, propuso una definición actualizada para estas células, teniendo en cuenta nuevos ensayos funcionales y análisis genómicos.

Según el autor, “una NKC es un linfocito NKp46+ CD3- presente en todos los mamíferos”, que depende de la IL-15 y responde a la IL-12. Luego de su maduración, las NKC son una fuente de IFN- $\gamma$ , y lisan células que perdieron la expresión del CMH-I, y que expresan moléculas inducibles por estrés (ej: los ligandos del receptor activador NKG2D -NKG2DLs-) o moléculas microbianas (ej: el m157 del citomegalovirus murino o agonistas del TLR-3)”. En los humanos hay 2 subpoblaciones de NKC, con funciones especializadas diferentes. El 90% expresa bajos niveles del CD56 (CD56 dim ), y altos niveles del receptor para el Fc- $\gamma$  de la IgG o CD16 (CD16 bright ). Estas células lisan células tumorales, in vitro e in vivo, y producen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). No expresan CCR7 ni L-selectina (CD62L), pero expresan LFA-1 y otras moléculas de adhesión, por lo que migran a los tejidos periféricos donde ejercen su actividad <sup>(38)</sup>.

El 10% restante, expresa altos niveles de CD56 (CD56 bright), y niveles bajos o nulos de CD16 (CD16dim o CD16-). Constituye una fuente de citoquinas inmuno-regulatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-10, IL-13, GM-CSF) con un papel importante en la RIC y en la RIA. Expresa CCR7 y L-selectina (CD62L), lo que les confiere la habilidad de migrar y anidar en ganglios linfáticos, donde liberan las citoquinas que regularan la respuesta de los LT y LB. <sup>(38)</sup>.

El 10% restante, expresa altos niveles de CD56 (CD56 bright), y niveles bajos o nulos de CD16 (CD16dim o CD16-). Constituye una fuente de citoquinas inmuno-regulatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-10, IL-13, GM-CSF) con un papel importante en la RIC y en la RIA. Expresa CCR7 y L-selectina (CD62L), lo que les confiere la habilidad de migrar y anidar en ganglios linfáticos, donde liberan las citoquinas que regularan la respuesta de los LT y LB. <sup>(38)</sup>.

### **Los receptores de las NKC:**

La identificación de sus receptores contribuyó a entender su reactividad y especificidad. A diferencia de los LT y LB, las NKC no emplean un único receptor para reconocer a las células blanco. Por el contrario, expresan receptores asociados a cascadas de señalización intracelular específicas, que se dividen en inhibidores y activadores de la citotoxicidad .

Desde el punto de vista genético, existen 2 grupos de receptores:

- 1): el complejo de receptores leucocitarios o LRC (leukocyte-receptor-complex), y,
- 2): el complejo de receptores de la citotoxicidad natural.

El grupo de los LRCs con 2 familias de genes se encuentran en el cromosoma 19 humano: los receptores de tipo KIR (killer-immunoglobulin-like receptor), y los receptores ILT (immunoglobulin-like-transcripts) o LIR (leukocyte-inhibit-receptors). Por otra parte, los

genes del NKC mapean en el cromosoma 12 humano y están compuestos por la familia de genes NKG2 (CD94/NKG2A,-B).<sup>(46)</sup>

### **Los receptores inhibidores:**

Desde que las NKC se descubrieron quedó claro que destruyen a sus células “blanco” que no expresan CMH-I. Los tumores murinos que carecen del CMH-I, son atacados de por las NKC, in vitro y/o in vivo. Así, las células “blanco” susceptibles de ser destruidas por las NKC tienen expresión defectuosa de uno o más alelos de CMH-I. Esta pérdida ocurre en malignidades o en la infección por virus. Por ello, líneas tumorales como la K562 (de la leucemia mielocítica crónica), la Molt 4 (de la leucemia linfoblástica aguda) o la Daudi (del linfoma de Burkitt), son usadas como “blanco” para ensayos con NKC, porque no expresan CMH-I.

En los humanos y en los ratones, las NKC no destruyen células con el CMH-I normal, pero en los ratones transgénicos con CMH-I y con células deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina son destruidas por las NKC. Las NKC humanas destruyen líneas celulares linfoblásticas que tienen CMH-I deficiente, pero las NKC son incapaces de matar estos “blancos” cuando son transfectados con genes HLA-B y HLA-C normales.

Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática un dominio ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina, cuya secuencia es V/Ix Y xx L/V), que luego de fosforilarse recluta fosfatasa de la familia SHP-1, que previenen funciones efectoras de las NKC.

El porqué de los efectos inhibidores del CMH-I en la actividad de las NKC, propuso la hipótesis de “un receptor inhibidor”, donde las NKC expresan receptores para el CMH-I, que discriminan a sus alelos, y que dan señales que inhiben los mecanismos de lisis de las NKC.

Los ligandos para los receptores activadores de las NKC se expresan en las células sanas bajo un estricto control negativo por sus receptores inhibidores polimórficos, que reconocen a los alelos CMH-I, y evitan la destrucción de las células normales. Aunque las NKC poseen receptores para el CMH-I propio y para el CMH-I ajeno, todos expresan un receptor inhibidor del CMH-I, en las células propias, asegurando que puedan ser reconocidos y protegidos de la citólisis.

Un receptor inhibidor de las NKC, no interactúa con todos los CMH-I, por lo que cada receptor identifica a un grupo de antígenos CMH-I que comparte una región antigénica. Los más importantes son los : receptores Ly49, KIR, CD94/NKG2 y KLRE-1.

### **El complejo de los receptores leucocitarios (LRC).**

**Los receptores KIR:** Originalmente definidos como las moléculas p50 y p70, fueron bautizados como KIR (killer-immunoglobulin-like receptor), y juegan un papel en el reconocimiento del CMH-I propio para proteger a las células normales de la lisis por las NKC. Los KIR son glicoproteínas de la super-familia de las Igs, y como el CMH-I muestran un alto polimorfismo genético. Se codifican en el cromosoma humano 19, y son 10 los miembros de la familia KIR aunque sólo 2 de ellos han sido identificados. En las NKC, el reconocimiento de los alelos HLA-A,-B y -C está mediado por miembros de la familia KIR (CD158), codificados en el LRC. La subfamilia KIR-3D contiene 3 dominios, mientras que la subfamilia KIR-2D contiene 2. A su vez, los dominios citoplasmáticos de los KIR pueden ser largos (L) o cortos (S), de acuerdo con su función de receptor inhibitorio o activador. Los KIRs inhibitorios contienen 1 ó 2 ITIM en sus dominios citoplasmáticos. Los receptores activadores no señalizan directamente, sino que se asocian no covalentemente con moléculas adaptadoras ITAM, que traducen señales. Es una excepción, el receptor KIR-2DL4, que posee un dominio citoplasmático largo, con un ITIM, con función activadora. En general, los KIR-3D reconocen alelos HLA-A, y -B, mientras que los receptores KIR-2D reconocen alelos HLA-C. Los KIR inhibitorios se expresan en los LT activados.

**Los receptores ILT (o LIR):** La familia ILT/LIR son 13 genes que codifican proteínas con 2 ó 4 dominios extracelulares de la super-familia de las Igs. Estos receptores están en los monocitos, M, CDs, LB y NKC. La presencia del ITIM en el citoplasma de los ILT2, 4, 5 y 8, sugiere que actuarían como receptores inhibitorios, como los KIRs. El ILT2 (LIR-1), se une al CMH-I, incluyendo la molécula no clásica HLA-G.

El ILT2 se expresa en los monocitos, M, LB, CD8 y NKC, y modula sus funciones efectoras.

#### **El Ly49 (KLR):**

También llamado Ly49A, fue el primer receptor de la NKC, responsable del reconocimiento del CMH-I en el ratón. Confiere un reconocimiento específico del CMH-I en el H-2Dd, que inhibe a las NKC.

Con anticuerpos bloqueadores y la transfección del CMH-I, el Ly49A es un receptor específico para el CMH-I del ratón para los haplotipos d y k (H-2Dd y H-2Dk).

Más aún, células diferentes a las NKC, transfectadas con un ADNc, Ly49A se adhirió a las células blanco transfectadas H-2Dd.

Los receptores murinos Ly49 son glicoproteínas de membrana tipo II, de la super-familia de la lectina tipo C, codificados por 9 genes relacionados que se encuentran en el cromosoma 6 del ratón, denominado “gen del complejo NK”.

Se expresan en la superficie de las NKC y LT como homodímeros. El receptor Ly49 interacciona con H-2Dd uniendo los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , y requiere la asociación de  $\beta 2$ -microglobulina. La composición de los péptidos H-2-Dd no parece afectar el reconocimiento Ly49A, aunque se sustituya una alanina.

Los Ly49A, Ly49C, Ly49G2 y Ly49I, contienen inhibidores ITIM, para la citólisis de las NKC contra la célula “blanco”. El Ly49A reconoce moléculas H2-Dd y 2-Dk, mientras que Ly49C es más amplio para el CMH-I, incluyendo haplotipos d, b, k y s.

El Ly49G es un receptor específico para Dd y Ld. En contraste, Ly49D carece de sitios ITIM, y se considera más bien un receptor activador de la citotoxicidad, y destruye células asociado al DAP12. <sup>(45)</sup>.

Los Ly49A, Ly49C y Ly49G2 son expresados en las NKC, en un 20% 40% y 45%, respectivamente, en ratones B6 (C57BL/6J, H-2Db). Cerca del 80% de las NKC expresan al menos uno de estos 3 receptores, sugiriendo que los NKC expresarían un miembro de la familia Ly49.

En las ratas, los genes homólogos de ratón Ly49 están en el cromosoma 4. En los humanos, los genes homólogos del Ly49, no han sido aún identificados.

#### **El CD94/NKG2 (KLR):**

Se expresan en las NKC humanas y en los LT, son miembros de la super-familia de las lectinas tipo C. Difieren de los KIR en estructura y especificidad, pero inhiben la función de las NKC de una manera similar.

Es una glicoproteína relacionada con el reconocimiento de haplotipos HLA-A, B o C. La cola citoplasmática del CD94 es de 7 aminoácidos de largo, sin una función de señalamiento, además de que carece de los sitios de fosforilación ITIM o ITAM.

El CD94 se asocia con el NKG2 y forma un receptor que da la señal intracelular. Son heterodímeros unidos por enlaces disulfuro, con una unidad que no varía, que es el CD94 unido a una glicoproteína codificada por el gen NKG2. El CD94 es codificado por un solo gen y la familia NKG2 con 4 genes llamados: NKG2A, NKG2C, NKG2E y NKG2D/F, además del NKG2B (una variante del NKG2A).

El CD94 y el NKG2 se expresan por genes ubicados en el cromosoma 12p del llamado “gen del complejo NKC” humano, el cual tiene su contraparte en el ratón en el cromosoma 6 y en la rata en el cromosoma 4.

Los NKG2 son incapaces de ser expresados en la membrana celular, al menos que se unan al CD94. Así, la función primaria del CD94 es servir de “chaperón” para el transporte del NKG2 a la superficie celular, para estabilizar la molécula. El CD94/NKG2A reconoce al HLA-E. La lisis de las NKC sobre las CD8 autólogas inmaduras (baja expresión del CMH), mediada por este receptor, pone de manifiesto la interfase entre la RIC y la RIA.

Varios receptores NKG2 contienen ITIM, a excepción del NKG2C que carece de ITIM o ITAM. Se considera que el CD94/NKG2 podría ser el homólogo humano del Ly49;

se han clonado homólogos de los CD94 y NKG2 humanos en rata. Estos genes están en el cromosoma 4 de la rata o “gen del complejo NKC” <sup>(10)</sup>.

#### **El KLRE1:**

Es un receptor de las NKC de las lectinas tipo C codificado en la rata y el ratón. Es una

proteína trans-membrana tipo II con un dominio como lectina COOH-terminal. No contiene ITIM ni un aminoácido cargado positivamente en el dominio trans-membrana, pero recluta SH1-P para generar un receptor inhibitorio en las NKC.

#### **Los receptores activadores:**

Para su activación las NKC necesitan la unión de sus receptores activadores con el ligando de la célula “blanco”. Esta interacción es el estímulo para la producción de sus citoquinas y de su actividad citotóxica. El proceso es regulado por receptores inhibidores y citoquinas que aumentan, limitan o terminan la respuesta.

Los activadores contienen residuos cargados en sus dominios trans-membrana, que les permiten interactuar con moléculas de señalamiento intracelular, como son: RFc $\epsilon$ , CD3z y DAP12 <sup>(11, 12)</sup>. Entre los activadores más importantes de las NKC, se encuentran: CD16, CD2, CD28 y CD161, que, no señalizan directamente, sino que se asocian no covalentemente con otras moléculas adaptadoras con motivos ITAM que sirven como transducción de señales.

#### **El CD16:**

Es un receptor de membrana plasmática que con el CD56 sirven para diferenciarlas de los LT, los que son CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>. Es de la familia del super-gen de las Igs, con baja afinidad y se conoce como RFc $\gamma$ III o RFc $\gamma$ IIIa o como Ly-17.

El CD16 es un polipéptido glicosilado con 21 aminoácidos en su tallo citoplasmático, y expresado en el 80% a 90% de las NKC humanas y de ratón; se expresa en M activados y en PMN. En el humano esta glicoproteína está codificada en el cromosoma 1.

El CD16 permite la ADCC que destruye a la célula “blanco” cubierta de IgG. <sup>(9, 13)</sup>. Después de ligar a su “blanco”, el CD16 inicia la transducción de señales, con un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular y una cascada de la activación, que resulta en la secreción del TNF $\alpha$ , perforinas, granzimas y granulolisinas, con capacidad citolítica .

#### **El CD2:**

Conocido como el LFA-2 o Ly-37, es una glicoproteína de membrana del super-gen de las Igs expresado en las NKC y LT. Su ligando es la glicoproteína CD58. Esta tiene funciones de activación/co-estimulación y adhesión, por lo que CD2 es un receptor co-estimulador que aumenta, pero no inicia la activación, ya que ratones "knock-out", el CD2 tiene una función normal en las NKC.

#### **El CD28:**

Esta glicoproteína es un homodímero con enlaces disulfuro de la familia del super-gen de las Igs, y se une a los ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Es un receptor de señalización intracelular para proliferación, producción de IFN $\gamma$  y destrucción de células tumorales.

#### **El CD 161 (NKR-P1):**

Tres genes que lo codifican se identificaron en el ratón y la rata, y se conocen como NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1C. Sólo uno de ellos está las NKC humanas. <sup>(10)</sup>. Pertenece a la super-familia de las lectinas-C, u homodímeros, de 80 kDa, unidos por enlaces disulfuro en las NKC y LT. Se hallan en el cromosoma 6 del ratón, en el 12 del hombre y en el 4 de la rata, en la región del “gen del complejo NKC”. Los NKR-P1C o CD161c son conocidos como NK1.1 o Ly-55.

Con anticuerpos monoclonales (moAb) para NKR-P1 de las NKC humanas se demostró que podrían existir iso-formas. Por ejemplo, NKR-P1B contiene ITIM, que son inhibidores, por lo cual, la familia NKR-P1 podría inhibir y no activar a las NKC.

#### **El complejo de receptores de la citotoxicidad natural de las NKC: CD94 /NKG2.**

Los genes que codifican para el CD94/NKG2 están en el complejo NKC. La subunidad CD94 del receptor es invariante y está codificada por un solo gen. La NKG2 es una familia multigénica de 5 proteínas, llamadas NKG2A (y su variante por splicing alternativo NKG2B), NKG2C, NKG2D y NKG2E. <sup>(53, 54)</sup>. Los dominios extracelulares de unión al ligando de NKG2A/B, -C y -E, comparten un alto grado de homología.

Los dominios citoplasmáticos son largos (NKG2A/B) o cortos (NKG2C y E), correspondientes a iso-formas inhibitorias o activadoras. <sup>(47, 55)</sup>.

Los heterodímeros CD94/NKG2A o B, poseen ITIM en su cola citoplasmática. El

heterodímero CD94/NKG2C se asocia por su cola con la proteína adaptadora DAP12, que señala a la cadena CD3 $\zeta$  por la activación de tirosina-quinasa luego de la fosforilación del ITAM del citoplasma.

Los heterodímeros CD94/NKG2A, B y C, son receptores para la molécula no clásica del CMH-I, el HLA-E cuya expresión en la superficie celular requiere de un péptido de la secuencia líder de cadenas  $\alpha$  del CMH-I (HLA-A, -B, -C y -G).

La disminución en la síntesis del CMH-I reduce la expresión del HLA-E por una menor disponibilidad del péptido necesario para el ensamblaje, estabilización y transporte a la superficie celular del HLA-E. La expresión de los niveles normales del HLA-E, es un indicador de la biosíntesis del CMH-I. Los CD94/NKG2 monitorean la integridad de la vía de síntesis del CMH-I y detectan alteraciones inducidas por proteínas codificadas en el genoma de diferentes virus.

#### **Los receptores no específicos de las moléculas del CMH-I:**

Algunos receptores no específicos del CMH-I son activadores. Entre ellos se encuentran proteínas adaptadoras con ITAM, tales como el CD16 y los receptores activadores de citotoxicidad (NCR). Otro grupo está compuesto por proteínas adaptadoras sin motivos ITAM. Aquí hallamos a los CD2, CD2-2B4, CRACC, NTB-A, DNAM-1, NKp80 y al NKG2D, muy estudiado actualmente.

#### **Los NCR:**

Son 3 receptores activadores de la citotoxicidad de las NKC. Pertenecientes a la superfamilia de las Igs, y fueron denominados NKp46<sup>(68)</sup>, NKp44<sup>(69, 70)</sup> y NKp30<sup>(71)</sup> y son un grupo emergente llamado NCR (Receptores de Citotoxicidad Natural). Son glicoproteínas trans-membrana de 46, 44 y 30 kDa, y están involucrados en el reconocimiento y la lisis de las células tumorales humanas<sup>(43)</sup>.

El NKp46 es expresado por todas las NKC (en reposo y activadas), por lo que se sugiere como un excelente marcador de las NKC.<sup>(28)</sup> Su porción citoplasmática no contiene ITAM, pero la región trans-membrana tiene un aminoácido cargado positivamente (R), que está involucrado en la estabilización de la interacción con las proteínas adaptadoras CD3 $\zeta$  y RF $\epsilon$ L.

El NKp44 está restringido a las NKC activadas por la IL-2, mientras que está ausente en NKC no activadas de sangre periférica. En su región trans-membrana posee un aminoácido cargado positivamente, que se asocia al DAP12.<sup>(69)</sup>

El NKp30 se expresa en todas las NKC, y se une al CD3 $\zeta$ , a través de un aminoácido cargado positivamente de la región trans-membrana.

Los NKp44 y NKp46 son sialilados, y se unen a la hemaglutinina del virus de la influenza, y así, reconocen células infectadas con el virus y activan la función citotóxica de las NKC.<sup>(72, 73)</sup>

El NKp30 reconoce a las CDs<sup>(32)</sup>. Además, los NKp30, NKp44 y NKp46, reconocen y lisan a las células tumorales<sup>(74)</sup>. Se demostró que los proteoglicanos del heparan-sulfato en la superficie de las células blanco están involucrados, los ligandos reconocidos de estas células por los NKp30, 44 y 46, son aún desconocidos.<sup>(75, 76)</sup>

#### **El NKp 80:**

El NKp80<sup>(65)</sup> es una lectina de tipo C y se expresa como homodímero sólo en la superficie de las NKC. Su ligando es el AICL, específico de las células mieloides, monocitos, M y PMN. Hay pruebas que demuestran que la interacción entre el NKp80 y el AICL, actúa en las NKC y las células mieloides, e influye en la respuesta inmune.

#### **El NKG2 D:**

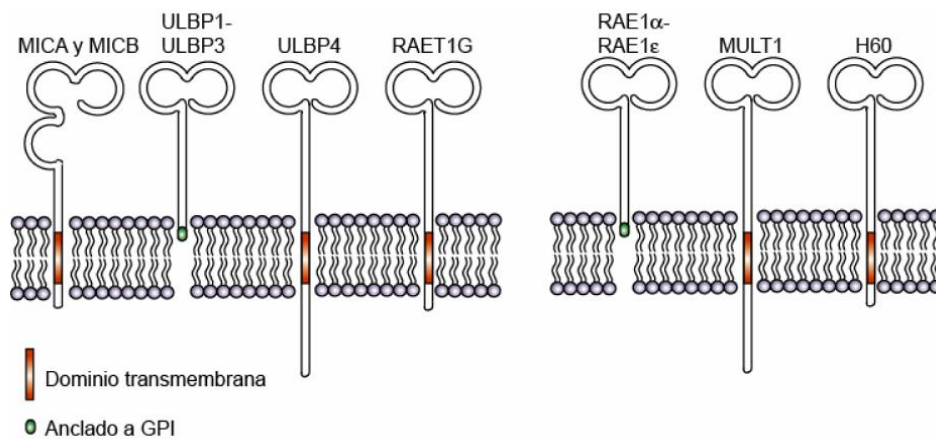
Fue identificado en 1991 por Houchins, con un ADNc expresado por las NKC humanas<sup>(54)</sup>. Es una molécula de trans-membrana del tipo II de la familia de las lectinas del tipo C. A diferencia de otros NKG2, NKG2D no se asocia con el CD94, y se expresa como homodímero en la superficie celular en todas las NKC y LT $\gamma$  $\delta$  y  $\alpha$  $\beta$  y LTCD8+. Este homodímero se une a la proteína DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones<sup>(78, 79)</sup>. La DAP10 no contiene ITAM, pero tiene un motivo YxxM, que se une a la subunidad p85 de la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) y a Grb, mientras que DAP12 contiene un ITAM citoplasmático que activa

a las tirosina-quinasas Syc o ZAP-70, que desemboca en la citotoxicidad. Por otra parte, su expresión aumenta por efecto de la IL-12 y del IFN- $\alpha$  en las NKC, y por la IL-15 en los LT-CD8 (41, 78, 81, 82).

El NKG2D es co-estimulador en las NKC, cuando éstas son activadas por los NKp30, NKp44, NKp46 o NKp80, o como ligandos sobre células blanco. (67). Esta función dual hace que el NKG2D sea muy versátil (79, 83, 84), y clave durante las RIC y RIA. La estimulación de las NKC a través del NKG2D gatilla una señal tan intensa que sobrepasa a la señal inhibitoria disparada por el CMH-I y por los receptores inhibitorios KIRs conduciendo a la lisis de la célula blanco.

#### Los ligandos del NKG2D:

El NKG2D del ratón reconoce a las proteínas Rae1 (85), H60 (85) y MULT1(86). Este se expresa en tejidos normales, pero Rae1 y H60 se expresan en tumores murinos. En los humanos, el NKG2D reconoce a las moléculas UL16 binding-proteins (ULBP)-1, ULBP-2 y ULBP-3 (87, 88). Este grupo de moléculas ancladas al GPI (glicosil-fosfoinositol), de tejidos normales, también se observan en tumores de diversos fenotipos (87, 88). En los humanos, y otros mamíferos, pero no en ratón, existe otro grupo de ligandos del NKG2D (NKG2DL). Estas moléculas son proteínas de membrana llamadas MICA y MICB. (77). (Fig. 18).



**Fig. 18 :** Representación esquemática de los ligandos del NKG2 D. Tanto en los humanos (izquierda) como en el ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios trans-membrana.

#### Los genes MIC:

Estos fueron identificados en 1994 por el grupo de Spies. Esta familia se compone de 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudo-genes (90-92), cuya ubicación se muestra en la **fig. 19**.

Los genes MIC están conservados en los mamíferos, pero no en el genoma murino. Los genes MICA y MICB, de 11,7 kpb y 12,9 kpb, son largos comparados con los genes del CMH, que tienen una longitud promedio de 3,5 kpb (95, 96). Pero, la estructura genómica general semeja a la de los genes del CMH-I, donde distintos dominios están codificados por distintos exones (97). MICA posee un primer intrón muy largo (90), donde existen sitios de unión para factores de transcripción como NF $\kappa$ B (98). El gen de MICA codifica para un ARNm de 1.382 nucleótidos (nt) que contiene un marco de lectura abierta de 1.149 nt, originando un poli-péptido de 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa (90). Esta longitud varía de acuerdo al número de repeticiones de alanina del segmento transmembrana de diferentes alelos. El gen de MICB genera un transcripto de 2.376 nt y un marco de lectura abierto de la misma longitud que MICA, con quien comparte un 83% de similitud de secuencia amino-acídica (96). La homología entre MICA y otros genes del CMH-I es muy baja, siendo del 15 al 21% en el dominio  $\alpha$ 1, del 19 al 30% en el dominio  $\alpha$ 2 y del 32 al 36% en el dominio  $\alpha$ 3. (90).

Esta baja homología entre los genes MIC y los genes del CMH-I es reflejo de una



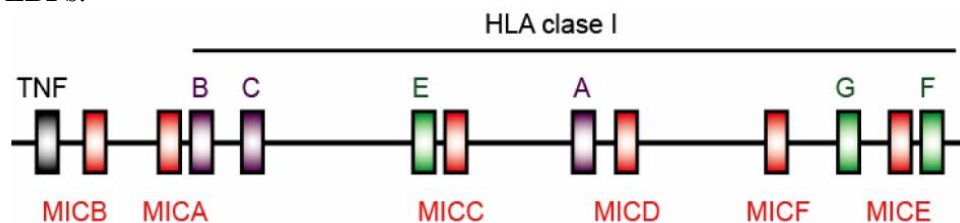
diversificación muy temprana en la evolución. La presencia de 8 sitios de N-glicosilación en MICA y 5 en MICB, contrasta con el único sitio de glicosilación del CMH-I, el que a su vez está ausente en MICA y MICB <sup>(90)</sup>.

La proteína MICA nativa está altamente glicosilada, lo que incrementa su peso molecular de 43 (péptido desnudo) a 65 kDa (proteína madura) <sup>(100)</sup>. Además, no requiere de la  $\beta$ 2-microglobulina ni del procesamiento antigénico o de las proteínas TAP para su expresión en superficie <sup>(101, 102)</sup>.

Al igual que los genes del CMH-I, MICA y MICB son polimórficos y codominantes <sup>(104)</sup>, conociéndose más de 60 alelos de MICA <sup>(105-108)</sup> y 30 alelos de MICB <sup>(109-111)</sup>. La mayoría de los sitios polimórficos varían en posiciones nucleotídicas no redundantes, con predominancia en los dominios  $\alpha$  2 y  $\alpha$  3.

La gran divergencia entre MICA y MICB reside dentro de los exones del segmento transmembrana. A diferencia de MICB, MICA posee variaciones en el número de repeticiones de la secuencia en tándem GCT, que codifica para diferente número de alaninas. Los alelos más frecuentes en los grupos étnicos son MICA\* 008, seguido por MICA\* 002, MICA\* 004 y MICA\* 010, dependiendo de las poblaciones. Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, pues por una delección en la región del CMH, el 0,1024% de la población japonesa carece completamente del gen de MICA y el gen de MICB contiene un codón de terminación prematuro <sup>(116)</sup>.

A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de los genes funcionales del CMH-I, los individuos MIC son normales. Esto se debe a que existe redundancia en los NKG2DL, y sí las proteínas MICA y MICB están ausentes, su función se reemplaza por otro ligando, como los ULBPs.



**Fig 19 :** Ubicación de los genes de la familia MIC en la región del CMH-I. Se muestran los genes para las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, así como los 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudo-genes (MICC, MICD, MICE y MICF).

#### Donde y cómo se expresa MICA:

Tiene un patrón de expresión restringido a las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, los monocitos y el epitelio gastrointestinal, pero no se expresa en LT o LB en reposo <sup>(100, 102, 117)</sup>. En la región 5' del gen de MICA hay un elemento regulador del estrés térmico, similar al que se encuentra en el gen de la proteína del estrés térmico de 70 kDa (HSP 70). <sup>(100)</sup>. La expresión de MICA es regulada por el estrés térmico <sup>(100)</sup> y el estrés oxidativo. También se vio en los fibroblastos y las células endoteliales infectadas in vitro con el citomegalovirus (CMV). <sup>(119)</sup>

Las células infectadas con CMV escapan al reconocimiento de los LT debido a que expresan productos virales que impiden el procesamiento de antígenos y la expresión del CMH-I. <sup>(120)</sup>

Al inducir la expresión de MICA, el virus facilita el reconocimiento por el NKG2D, lo que aumenta la respuesta de los LTCD8+ específicas del virus. <sup>(50)</sup>. El aumento de los NKG2DL se ve contrarrestado pues la proteína viral UL16 produce una disminución en la expresión de MICB y los ULBP - 1 y - 2. <sup>(121, 122)</sup>. Además, el CMV es capaz de inducir la degradación de MICA. <sup>(123)</sup>. El alelo MICA\* 008 (que posee una inserción que genera un codón stop-prematuro y una proteína truncada que carece de la porción citoplasmática, pero que mantiene su capacidad de estimular a las NKC), es resistente a esta degradación mediada por el virus. <sup>(123)</sup>

#### El análisis de las causas de los distintos tipos de cánceres.

Un gran número de agentes físicos -como los rayos X o  $\gamma$  o la luz ultravioleta, y químicos

como el metil-colantreno, el metano, las nitrosaminas, el arsénico, los componentes del humo del tabaco, y muchos otros, se asocian etiológicamente a diversos cánceres, tanto en el hombre como en los animales.

Debe agregarse también, la capacidad oncogénica de diversos virus sobre todo en mamíferos (incluidos primates) y en aves. En los humanos hay virus que se consideran asociados causal o co-causalmente a los tumores malignos. El virus de Epstein Barr al linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo, el virus del papiloma humano a cánceres urogenitales, el virus de la hepatitis B a los tumores hepáticos, el virus HTLV (human T leukemia virus) a la leucemia de células T en adultos, etc. (Lajer y von Buchwald ; Tsai, WL, 2010).

Con las técnicas de genética molecular se elaboró una interpretación del cáncer unificada, según la cual los carcinógenos físicos, químicos o virales tendrían una acción común, que sería la mutación de genes celulares (oncogenes y anti-oncogenes) que participan en el control de la proliferación celular. (Hahn y Weinberg, 2002).

Según esta hipótesis, el cáncer es concebido como la combinación de daños y cambios que inducen a una célula normal de un individuo sano a crecer en forma autónoma, aun cuando el estímulo inicial haya desaparecido, y a pesar de los sistemas que vigilan y modulan la división celular. Los mecanismos que inician este proceso involucran una serie de alteraciones irreversibles en la maquinaria genética de la célula normal que se trasladan a las sucesivas generaciones de células hijas.

Luego de un período variable la población celular de los tumores malignos se torna heterogénea, y ello permite la selección o evolución de variantes cada vez más agresivas e incontrolables para los sistemas de defensa propios del organismo, y para las terapias que se aplican para controlar la enfermedad, fenómeno que se conoce como progresión tumoral. Las células cancerosas llevan antígenos propios y antígenos que se definen como asociados al cáncer, éstos las marcan como anormales o foráneas y pueden hacer que los LT-CD8+ lancen un ataque contra ellas (17). Los antígenos asociados al cáncer pueden ser: propios producidos en cantidades mucho más grandes por las células cancerosas que por las células normales y, en esa forma, el sistema inmunitario las ve como foráneas; antígenos que no son producidos normalmente por el tejido en donde se forma el cáncer (por ejemplo, los que son producidos normalmente sólo por tejido embrionario, pero que se expresan en un cáncer adulto) y, así, son vistos como foráneos por el sistema inmunitario, y, los que se forman recientemente, o neo-antígenos, que resultan de mutaciones de genes en las células cancerosas y que el sistema inmunitario no había visto antes. Muchos antígenos asociados al cáncer son sólo versiones ligeramente alteradas de los antígenos propios y, por esto, puede ser difícil que el sistema inmunitario los reconozca.

Las células cancerosas pueden sufrir cambios genéticos que conduzcan a la pérdida de los antígenos asociados al cáncer, evadiendo la respuesta de los LTCD8+ y NKC.

Como resultado de esto, aun cuando el sistema inmunitario reconozca como amenaza a un cáncer en crecimiento, el cáncer puede todavía escaparse ante un ataque del sistema inmunitario (8). Las vacunas son medicinas que refuerzan la habilidad natural del sistema inmunitario para proteger al cuerpo contra “invasores foráneos”, principalmente de agentes infecciosos que puedan causar enfermedades. Cuando un microbio infeccioso invade al cuerpo, el sistema inmunitario lo reconoce como foráneo, lo destruye, y “recuerda” impedir otra infección en caso que el mismo microbio lo invada de nuevo.

La mayoría de las vacunas se producen con versiones inocuas de microbios— destruidos o debilitados, o partes de ellos— que no causan enfermedad, pero que estimulan una respuesta inmunitaria, con la producción de anticuerpos y células muy específicas que los eliminan. Las vacunas contra el cáncer son una clase de sustancias que modifican la respuesta inmunológica.

**Hay 2 tipos de vacunas contra el cáncer:**

1.-

Vacunas preventivas (o profilácticas), las cuales tratan de impedir que se presente el cáncer en gente sana, y,

2.- Vacunas de tratamiento (o terapéuticas), las cuales tienen como objeto el tratamiento de un cáncer existente al reforzar la respuesta inmunitaria natural del cuerpo contra él. Las

vacunas de tratamiento son una forma de inmunoterapia. Dos tipos de vacunas preventivas (contra el virus del papiloma humano y contra el virus de la hepatitis B) están disponibles, y otras 2, de tratamiento (para el cáncer metastásico de próstata y el melanoma) están en avanzada fase experimental.

Las vacunas preventivas se dirigen a sustancias infecciosas que causan o contribuyen a que se forme el cáncer <sup>(10)</sup>. Son semejantes a las vacunas tradicionales, las cuales ayudan a impedir enfermedades infecciosas, como el sarampión o la polio, al proteger al cuerpo contra la infección. Tanto las vacunas de prevención de cáncer como las vacunas tradicionales están basadas en antígenos que son relativamente fáciles de reconocer como foráneos por el sistema inmunitario.

La mayoría de las vacunas de prevención, incluso las que se dirigen a virus que causan cáncer (virus de la hepatitis B y virus del papiloma humano), estimulan la producción de anticuerpos que se unen a microbios específicos y bloquean su habilidad para causar infecciones.

#### **Vacunas contra los virus del papiloma humano (VPH).**

Las infecciones persistentes por tipos de VPH de alto riesgo pueden causar cáncer de cuello uterino, cáncer de ano, cáncer de orofaringe y cánceres de vagina, de vulva y de pene. Tres vacunas están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para prevenir la infección por VPH: Gardasil®, Gardasil 9® y Cervarix®. Gardasil y Gardasil 9 están aprobadas para usarse en mujeres de 9 a 26 años de edad para la prevención de los cánceres de cuello uterino, de vulva, vagina y de ano causados por VPH, de lesiones precancerosas de cuello uterino, de vulva, vagina y de ano, y de verrugas genitales. Gardasil y Gardasil 9 fueron aprobadas también para usarse en hombres para la prevención de cáncer de ano causado por VPH y para lesiones precancerosas de ano y verrugas genitales. Gardasil fue aprobada para usarse en hombres de 9 a 26 años de edad, y Gardasil 9 fue aprobada para usarse en hombres de 9 a 15 años de edad. Cervarix fue aprobada para usarse en mujeres de 9 a 25 años de edad para la prevención del cáncer cervical (o cuello uterino) causado por VPH.

#### **Vacunas contra el virus de la hepatitis B (VHB).**

La infección crónica por el virus de la hepatitis B puede conducir al cáncer de hígado. La FDA ha aprobado muchas vacunas que protegen contra la infección por el VHB. Dos vacunas, Engerix-B y Recombivax HB, protegen sólo contra la infección por VHB. Ambas vacunas están aprobadas para usarse en individuos de todas las edades. Algunas otras vacunas protegen contra la infección por VHB así como por otros virus. Twinrix protege contra el VHB, y contra el virus de la hepatitis A, y Pediarix contra el VHB, contra el poliovirus, y la bacteria que causa difteria, tétanos y tos ferina. Twinrix está aprobado para usarse en personas de 18 años y más. Pediarix está aprobado para usarse en infantes cuyas madres no tienen el antígeno de superficie de VHB (HBsAg) y se administra desde las 6 semanas de edad hasta los 6 años. La vacuna original contra el VHB fue aprobada por la FDA en 1981, y así fue la primera vacuna de prevención de cáncer en ser producida y comercializada con éxito. Hoy en día, la mayoría de los niños están vacunados contra el VHB al poco tiempo después de nacer.

Las vacunas de tratamiento del cáncer se usan para tratar cánceres que ya se han formado; la intención es que retrasen o detengan el crecimiento; que se reduzca el tumor; impedir que regrese el cáncer; o eliminar las células cancerosas que no hayan sido destruidas por otras formas de tratamiento.

Las vacunas para tratar el cáncer se diseñan para que funcionen activando a los LTCD8+ y a las NKC, para que reconozcan y actúen contra tipos específicos de cáncer o para inducir la producción de anticuerpos. Dichos antígenos propios del tumor, causan una respuesta inmunitaria que resulta en la activación de las células T o en la producción de anticuerpos, que reconocen y se unen a los antígenos en la superficie de las células cancerosas, mientras que las NKC y los LTCD8+, detectan antígenos del cáncer dentro de las células cancerosas. La producción de vacunas efectivas de tratamiento ha resultado más difícil y problemática que la formulación de vacunas preventivas del cáncer <sup>(12)</sup>. Para ser efectivas,

las vacunas para tratamiento necesitan lograr 2 propósitos. Primero, como las vacunas preventivas, las vacunas de tratamiento, deben estimular respuestas inmunitarias específicas dirigidas al blanco correcto. Segundo, las respuestas inmunitarias deben tener la potencia suficiente para traspasar las barreras que usan las células cancerosas para protegerse de los ataques de las NKC y LTCD8+.

En abril de 2010, la FDA aprobó la primera vacuna para tratamiento del cáncer. Esta vacuna, sipuleucel-T (Provenge®), está aprobada para usarse en algunos hombres con cáncer metastático de próstata. Está diseñada para estimular una respuesta inmunitaria a la fosfatasa ácida prostática (PAP), un antígeno que se encuentra en la mayoría de las células cancerosas de la próstata. En estudios clínicos, sipuleucel-T aumentó cerca de 4 meses la supervivencia de los pacientes. <sup>(13)</sup>

Al contrario de algunas otras vacunas de tratamiento, sipuleucel-T se ajusta a cada paciente. Se formula al aislar células dendríticas de la sangre de un paciente por un procedimiento llamado leucocitoféresis. Estas células se cultivan junto con una proteína llamada PAP-GM-CSF. Esta proteína consiste de PAP unida a un factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF estimula al sistema inmunitario y mejora la presentación de antígenos. Las células dendríticas cultivadas con PAP-GM-CSF forman el componente activo de sipuleucel-T, que se inyecta al paciente. Ellos reciben 3 tratamientos, con una separación de 2 semanas, y cada ronda de tratamiento requiere el mismo proceso de fabricación. Aunque no se conoce el mecanismo preciso de acción de sipuleucel-T, parece que las células dendríticas con el o PAP-GM-CSF estimulan a las NKC y LTCD8+ para que destruyan las células tumorales que expresan PAP.

En octubre de 2015, la FDA aprobó la primera terapia oncolítica con virus, talimogene la herparepvec (T-VEC, o Imlygic®) para el tratamiento de pacientes con melanoma metastático que no pueden ser operados quirúrgicamente. Además de infectar y de causar lisis en las células cancerosas cuando se inyecta directamente en el melanoma, T-VEC induce respuestas en lesiones en donde no se inyectó, lo que sugiere que desencadena una respuesta inmunitaria contra el tumor, más amplia, semejante a las de otras vacunas anticancerosas.

Todas las vacunas preventivas aprobadas por la FDA hasta la fecha se han producido mediante el uso de antígenos de microbios que causan o contribuyen a la formación de cáncer. Esto incluye a antígenos de VHB y a tipos específicos de VPH. Estos antígenos son proteínas que ayudan a formar la superficie externa de los virus. Ya que solo se usa una parte de los microbios, las vacunas resultantes no son infecciosas y, por lo tanto, no pueden causar enfermedades.

Investigadores están creando también versiones sintéticas de antígenos en el laboratorio para usarse en vacunas preventivas. Para hacer esto, se modifica la estructura química de los antígenos para estimular respuestas inmunitarias que son más fuertes que las causadas por los antígenos originales <sup>(14)</sup>

En forma semejante, las vacunas de tratamiento se crean usando antígenos asociados al cáncer o versiones modificadas de ellos. Los antígenos que se han usado hasta ahora incluyen proteínas, carbohidratos, glucoproteínas o glucopéptidos (combinaciones de carbohidratos y proteína), y gangliósidos (combinaciones de carbohidratos y lípidos). Las vacunas de tratamiento se formulan mediante el uso de células cancerosas debilitadas o muertas que llevan antígeno(s) específicos o células inmunitarias modificadas para presentar tal antígeno(s) en su superficie. Estas células pueden originarse en el paciente mismo (llamada vacuna autógena, como con sipuleucel-T) o en otro paciente (llamada vacuna alógena). Algunas vacunas para el cáncer en su estadio tardío usan virus, levaduras o bacterias como vehículos (vectores) para depositar un antígeno o más en el cuerpo <sup>(15)</sup>. Estos mismos vectores son inmunogénicos naturalmente (es decir, pueden estimular una respuesta inmunitaria), pero están modificados para que no puedan causar enfermedades.



Otros tipos de vacunas de tratamiento son las hechas con moléculas de ADN o de ARN que contienen instrucciones genéticas para antígenos asociados al cáncer. El ADN o el ARN, pueden inyectarse solos en un paciente como vacuna de “ácido nucleico desnudo”, o empacada dentro de un virus inocuo. Después de que se inyecta el ácido nucleico desnudo o virus en el cuerpo, el ADN o ARN es absorbido por las células, las cuales empiezan a producir los antígenos asociados con el tumor. Los investigadores esperan que las células producirán suficientes antígenos asociados con el tumor para estimular una fuerte respuesta inmunitaria.

Ahora se usan varios antígenos diferentes asociados al tumor para hacer vacunas experimentales de tratamiento. Algunos de estos antígenos se encuentran en la mayoría de los tipos de células cancerosas o dentro de ellas. Otros son únicos a tipos específicos de cáncer (1, 5, 6, 13, 16-19).

Sustancias conocidas como adyuvantes se añaden con frecuencia a las vacunas para reforzar su habilidad de inducir fuertes respuestas inmunitarias contra el cáncer (20). Los adyuvantes usados para vacunas para cáncer se originan de muchas fuentes diferentes. Algunos microbios, como el bacilo Calmette-Guérin (BCG), pueden servir como adyuvante (21). Sustancias producidas por bacterias, como el Detox B (una emulsión aceitosa en forma de gotas de monofosforil lípido A y un esqueleto micobacteriano de pared celular) se usan con frecuencia también como adyuvantes. Productos biológicos derivados de organismos que no son microbios pueden usarse también como adyuvantes. Un ejemplo es la hemocianina de lapa californiana (KLH), la cual es una proteína grande producida por un molusco marino. Los antígenos que se pegan a la KLH han mostrado que aumentan su habilidad para estimular las respuestas inmunitarias. Alguna sustancia no biológica, como un aceite emulsificado conocido como montanide ISA-51, puede usarse como adyuvante. Las citocinas naturales o sintéticas pueden usarse también como adyuvantes. Algunas aumentan la actividad de los LB y de los LTCD8+, mientras que otras suprimen sus actividades. Las citocinas usadas con frecuencia en las vacunas de tratamiento del cáncer o que se dan junto con ellas son la interleucina 2 (IL-2), el interferón alfa (INF- $\alpha$ ), y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, conocido también como sargramostim) (22). Antes de autorizar cualquier vacuna, la FDA debe verificar que sea segura y efectiva. Las vacunas que tienen el fin de prevenir o de tratar el cáncer tienen perfiles de seguridad comparables a los de otras vacunas (6). Sin embargo, los efectos secundarios de las vacunas para el cáncer pueden variar entre las formulaciones de las vacunas y de una persona a otra.

El efecto secundario que se notifica con más frecuencia es la inflamación en el sitio de la inyección, incluso enrojecimiento, dolor, inflamación, calentamiento de la piel, comezón y ocasionalmente una erupción cutánea. Algunas personas experimentan síntomas como de gripe después de recibir la vacuna, incluso fiebre, escalofríos, debilidad, mareos, náuseas, vómitos, dolor muscular, fatiga, dolor de cabeza y ocasionalmente dificultad para respirar. La presión arterial puede afectarse también. Estos efectos secundarios, que en general duran sólo por un corto tiempo, indican que el cuerpo está respondiendo a la vacuna con una respuesta inmunitaria, como lo hace cuando se expone a un virus.

Otros problemas de salud más graves se han notificado en menos personas después de recibir una vacuna. Estos problemas pueden haber sido causados por la vacuna o no. Los problemas reportados han incluido asma, apendicitis, enfermedad inflamatoria pélvica y ciertas enfermedades auto-inmunitarias, incluso artritis y lupus eritematoso sistémico. Las vacunas que usan células o microbios pueden tener efectos secundarios adicionales. Por ejemplo, los efectos secundarios de sipuleucel-T son la infección cerca del sitio de inyección y la hematuria. Reacciones graves de hipersensibilidad (alérgicas) a ingredientes específicos de vacunas han ocurrido después de una vacunación.

**Pueden combinarse las vacunas de tratamiento con otros tipos de terapia contra el cáncer?** Sí. En muchos de los estudios clínicos de vacunas de tratamiento de cáncer que están ahora en curso, las vacunas se administran con otras formas de terapia para el cáncer. Las terapias que se han combinado con vacunas de tratamiento de cáncer incluyen la cirugía,

la quimioterapia, radioterapia, y algunas formas de terapia dirigida, incluso terapias que tienen como objeto reforzar las reacciones del sistema inmunitario contra el cáncer. Varios estudios han sugerido que las vacunas de tratamiento de cáncer pueden ser más efectivas cuando se administran en combinación con otras formas de terapia para cáncer (18,23). Por ejemplo, estudios preclínicos y estudios clínicos en fase inicial han demostrado que la radioterapia puede intensificar la eficacia de las vacunas de tratamiento de cáncer (24). Además, en algunos estudios clínicos, las vacunas de tratamiento de cáncer han parecido aumentar la efectividad de otras terapias para cáncer (18,23).

Evidencia adicional sugiere que la extirpación quirúrgica de tumores grandes puede intensificar la efectividad de las vacunas de tratamiento de cáncer (23). En pacientes con enfermedad extensa, el sistema inmunitario puede verse abatido por el cáncer. La extirpación quirúrgica del tumor puede facilitar que el cuerpo presente una respuesta inmunitaria efectiva. Los investigadores están diseñando también estudios clínicos para responder a cuestiones tales como si las vacunas de tratamiento de cáncer funcionan mejor cuando se administran antes, después o al mismo tiempo que otras terapias (7). Las respuestas a tales preguntas pueden no solo proveer información acerca de cómo usar mejor una vacuna específica de tratamiento de cáncer sino también revelar principios básicos adicionales que guíen la creación futura de terapias de combinación que incluyen vacunas. Avances recientes en el conocimiento de cómo las células cancerosas evitan ser reconocidas y atacadas por el sistema inmunitario proporcionan a los investigadores la información necesaria para diseñar vacunas de tratamiento contra el cáncer que puedan lograr ambos objetivos (16,25). Aunque los investigadores han identificado muchos antígenos asociados con cáncer, estas moléculas varían mucho en su habilidad para estimular una fuerte respuesta inmunitaria contra el cáncer. Dos campos principales de investigación están asignados a responder a este problema. Uno implica la identificación de antígenos novedosos asociados con cáncer, o neo-antígenos, que pueden resultar más efectivos en estimular respuestas inmunitarias que los antígenos que ya se conocen. Por ejemplo, un planteamiento de vacuna personalizada que se basa en neo-antígenos que está en pruebas clínicas en fase inicial comprende la identificación y puesta en el blanco de antígenos mutados específicos a los pacientes para crear vacunas de tratamiento para pacientes con glioblastoma y melanoma (26,27). El otro campo principal de investigación comprende la creación de métodos para incrementar la habilidad de los antígenos asociados con cáncer para estimular al sistema inmunitario. Hay también investigación en curso para determinar cómo combinar muchos antígenos con una sola vacuna de tratamiento de cáncer para producir respuestas inmunitarias óptimas contra el cáncer (28). Mejorar nuestro entendimiento de la biología básica como fundamento de cómo interactúan las células del sistema inmunitario y las células cancerosas será muy importante para concebir vacunas contra el cáncer. Como parte de este programa, se están creando nuevas tecnologías. Por ejemplo, un nuevo tipo de tecnología con imágenes permite a los investigadores observar las células T citotóxicas y las células cancerosas interactuando dentro del cuerpo (29).

Los investigadores están tratando también de identificar mecanismos por los que las células cancerosas evaden o suprimen las respuestas inmunitarias contra el cáncer. Al comprender mejor en qué forma las células cancerosas manipulan el sistema inmunitario se podría llegar a la formulación de fármacos que bloquean esos procesos, lo que mejoraría la efectividad de las vacunas de tratamiento de cáncer (30). Por ejemplo, algunas células cancerosas producen señales químicas que atraen glóbulos blancos conocidos como células T reguladoras, o Tregs, al sitio del tumor. Las Tregs liberan con frecuencia citocinas que suprimen la actividad de las células T citotóxicas (18, 31). La combinación de una vacuna de tratamiento de cáncer con un fármaco que impide la inactivación de las células T citotóxicas puede mejorar la efectividad de la vacuna al generar respuestas fuertes de las células T citotóxicas contra el tumor. Los moduladores inmunitarios de puntos de control pueden también mejorar la efectividad de las vacunas contra cáncer (32). Estos moduladores se apuntan a otro mecanismo inmunitario regulador usado por las células cancerosas para evadir la destrucción, uno que implica las proteínas de puntos de control inmunitarios como

el PD-1, el cual se expresa en la superficie de las células T. La unión de PD1 a proteínas compañeras específicas (o ligandos), llamadas PD-L1 y PD-L2, en la superficie de algunas células normales o células cancerosas crea una señal de “apagado” que dice a la célula T que no lance una respuesta inmunitaria contra esas células. (Esta unión hace que el sistema inmunitario no se exceda al actuar contra las células normales e impida la autoinmunidad). Algunas células tumorales expresan altas concentraciones de PD-L1, lo cual causa que las células T se “apaguen” y ayuda a las células cancerosas a evadir la destrucción inmunitaria. Los anticuerpos que bloquean la unión de una proteína de punto de control inmunitario a su ligando en una célula cancerosa eliminan esta señal de “apagado” y permiten que haya una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas.

Varios de esos anticuerpos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de algunos cánceres y están mostrando efectos prometedores en otros cánceres <sup>(33)</sup>. Ya que estas sustancias permiten que las células T sean más efectivas contra el cáncer, se espera que ellas también mejorarán la efectividad de las vacunas contra el cáncer. En verdad, se ha encontrado que sí lo hacen en modelos animales, y hay estudios clínicos en curso que combinan una vacuna con inhibición de PD1 o de PD-L1 <sup>(34)</sup>. Actualmente están en preparación varias vacunas diseñadas para tratar cánceres específicos <sup>(35-38)</sup>. Estas incluyen vacunas con células dendríticas para carcinoma metastático de células renales, glioblastoma y cáncer de próstata metastático refractario a hormonas; vacunas autólogas de células tumorales para cáncer colorrectal y linfoma folicular; vacunas antiidiotípicas para linfomas y algunos tumores sólidos; vacunas diseñadas para estimular una respuesta inmunitaria contra hormonas requeridas para el crecimiento y supervivencia de malignidades gastrointestinales; vacunas alogénicas para cáncer de pulmón; y vacuna con base en el ADN para cáncer metastático de seno. Muchos tipos de cáncer están en evaluación en estudios clínicos activos de prevención o de tratamiento por medio de vacunas. Las descripciones de estudios clínicos en curso que están probando vacunas para la prevención o el tratamiento de cáncer pueden obtenerse al buscar la [lista de estudios clínicos de cáncer](#) del NCI en su sitio web. La lista del NCI de estudios clínicos de cáncer incluye todos los estudios clínicos financiados por el NCI que se llevan a cabo en Estados Unidos y en Canadá, así como en el mundo.

Levy es pionera en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer, en la que los científicos tratan de aprovechar el sistema inmunitario para combatir el cáncer. La investigación en su laboratorio condujo al desarrollo de rituximab, uno de los primeros anticuerpos monoclonales aprobados para su uso como tratamiento anticancerígeno en humanos. Algunos enfoques de inmunoterapia dependen de la estimulación del sistema inmune en todo el cuerpo; otros se dirigen a puntos de control naturales que limitan la actividad anticancerígena de las células inmunes. Aún otros, como la terapia de células T CAR recientemente aprobada para tratar algunos tipos de leucemia y linfomas, necesitan que las células inmunológicas de un paciente se eliminen del cuerpo y se modifiquen genéticamente para atacar las células tumorales.

Muchos de estos enfoques han sido exitosos, pero tienen desventajas, desde efectos secundarios difíciles de manejar hasta tiempos de preparación o tratamiento de alto costo. "Todos estos avances en inmunoterapia están cambiando la práctica médica -señala Levy-. Nuestro enfoque utiliza una sola aplicación de cantidades muy pequeñas de dos agentes para estimular las células inmunes solo dentro del tumor. En los ratones, vimos efectos sorprendentes en todo el cuerpo, incluida la eliminación de tumores en todo el animal". Los cánceres a menudo existen en un extraño tipo de limbo con respecto al sistema inmune y las células inmunes como las células T reconocen las proteínas anormales que a menudo están presentes en las células cancerosas y se infiltran para atacar el tumor. Sin embargo, a medida que el tumor crece, suele diseñar formas de suprimir la actividad de las células T. El método de Levy funciona para reactivar las células T específicas para el cáncer inyectando cantidades de microgramos de dos agentes directamente en el sitio del tumor. Un microgramo es una millonésima de gramo. Uno de ellos, un tramo corto de ADN llamado oligonucleótido CpG, funciona con otras células inmunes cercanas para amplificar

la expresión de un receptor activador llamado OX40 en la superficie de las células T. El otro, un anticuerpo que se une a OX40, dispara las células T para dirigir la carga contra las células cancerosas. Debido a que los dos agentes se inyectan directamente en el tumor, solo se activan las células T que se han infiltrado en él. Estas células T son "preseleccionadas" por el cuerpo para reconocer solo proteínas específicas del cáncer. Algunas de estas células T activadas por tumores dejan el tumor original para encontrar y destruir otros tumores idénticos en todo el cuerpo. El enfoque funcionó sorprendentemente bien en ratones de laboratorio con tumores de linfoma de ratón trasplantados en dos sitios en sus cuerpos. Inyectar en un sitio del tumor los dos agentes causó la regresión no solo del tumor tratado, sino también del segundo tumor no tratado. De esta manera, se curó el cáncer en 87 de 90 ratones. Aunque el cáncer recidivó en tres de los ratones, los tumores retrocedieron nuevamente después de un segundo tratamiento. Los investigadores observaron resultados similares en roedores con tumores de mama, colon y melanoma. Los animales genéticamente modificados para desarrollar espontáneamente cánceres de mama en las diez almohadillas mamarias también respondieron al tratamiento. El tratamiento del primer tumor que surgió a menudo evitó la aparición de futuros tumores y elevó significativamente la esperanza de vida de los animales, hallaron los investigadores. Finalmente, Sagiv-Barfi exploró la especificidad de las células T trasplantando dos tipos de tumores a los ratones. Trasplantó las mismas células cancerosas de linfoma en dos lugares y una línea celular de cáncer de colon en un tercer lugar. El tratamiento de uno de los sitios de linfoma causó la regresión de ambos tumores de linfoma, pero no afectó al crecimiento de las células de cáncer de colon.

El sistema inmune [nos libra del cáncer](#) continuamente. Además de encargarse de rechazar las invasiones de microbios que amenazan nuestra salud, es capaz de destruir células tumorales antes de que se conviertan en un problema e incluso puede eliminar tumores ya formados. Lo que se podría ver como una curación milagrosa puede ser una buena reacción de las propias defensas ante el cáncer, pero no siempre son suficientes. Desde hace más de un siglo, se intuye el potencial de azuzar al sistema inmune contra los tumores, pero hasta la última década no se habían logrado éxitos importantes en la tarea. La situación ha cambiado. Idit Sagiv-Barfi, la primera autora del artículo, comprobó también el funcionamiento específico de la programación de las células del sistema inmune trasplantando tres tumores a un ratón, dos linfomas en dos lugares diferentes y un cáncer de colon en otro sitio. El tratamiento para uno de los linfomas hacía que el segundo desapareciese también, pero mantenía intacto el cáncer de colon, demostrando así la precisión del método. Ahora, según explican en la Universidad de Stanford, Levy y su equipo quieren reunir a 15 pacientes con linfoma para poner a prueba este nuevo enfoque. Si tuviese éxito, Levy cree que este tratamiento podría tener muchas aplicaciones. Por un lado, la inyección de sus dos agentes podría ser un complemento con el que tratar a pacientes antes de que se les extirpase su tumor primario con cirugía. Esta técnica serviría para eliminar también tumores secundarios que hubiesen surgido a partir del principal y que podrían haber pasado desapercibidos. Los autores plantean incluso la posibilidad de diseñar tratamientos que bloqueen el crecimiento futuro de tumores que surgen por mutaciones genéticas, como los BRCA1 y 2 en mama.

## **BIBLIOGRAFIA.**

- [1] : Bruce A : Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 5 ed., 2008.
- [2] : Tiina R, Chapman J. : Mathematical models of avascular tumor growth, SIAM Rev., 2007, 49 ; 179 - 208.
- [3] : Jones D.S., Sleeman B.D. : Differential equations and mathematical biology. In : Mathematical Biology and Medicine Series, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL, USA, 2003.
- [4]: Tsai W.L. : Viral hepato-carcinogenesis. Oncogene, 2010 ; 29: 2309-2324.



- [5] : Hahn, W. C. , Weinberg R.A. : Rules for making human tumor cells." N Engl J Med, 2002 ; 347 (20): 1593-1603.
- [6] : Ausprunk D.H, Folkman J : Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvas. Res. 1974; 14 : . 53 - 65.
- [7] : Chaplain M.A.J., Stuart A. : A mathematical model for the diffusion of tumor angiogenesis factor into the surrounding host tissue. J. Math Appl. Med. Biol., 1991; 8 : 191-220.
- [8]: Darren W.D, Herbst R.S., Abbruzzese J.L. : Antiangiogenic Cancer Therapy, CRC Press, 1a ed., 2008.
- [9] Gonzalez Baron M., Ordonez A., Feliu J., Zamora P., De Castro J. : Oncologia Clinica, vol. 1, 1998.
- [10] Naumov G.N., Heymach J., Dr. Folkman's legacy : a life of angiogenesis research, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 2008; 116 ; 89 - 92.
- [11]. Gordon, S., Taylor P.R. : Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, 2005 ; 5 (12): 953-64.
- [12]. Tacke, F., Randolph G.J: Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, 2006, 211 (6-8): 609-18.
- [13]. Zou, W. : Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. J Immunol, 2000. 165 (8): . 4388-96.
- [14]. Akagawa, K.S., Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte derived macrophages. Int J Hematol, 2002. 76 (1): 27-34.
- [15]. Van Voorhis, W.C.; Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. J Exp Med, 1982. 155 (4): 1172-87.
- [16]. Kubach, J.: Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. Int J Hematol, 2005. 81 (3): 197-203.
- [17]. Banchereau, J. : Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2000; 18: 767-811.
- [18]. Nakano, H., Yanagita, M. : CD11c(+) B220 (+) Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med, 2001. 194 (8): 1171-8.
- [19]. van Furth, R., Origin and turnover of monocytes and macrophages. Curr Top Pathol, 1989. 79: 125-50.
- [20]. Barreda, D., Hanington P. and Belosevic M : Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. Dev Comp Immunol, 2004. 28 (5): 509-54.
- 21.-Pardoll D. Cancer immunology. In: Abeloff M, Armitage J, Niederhuber J, Kastan M, McKenna W, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2008.
- 22.-Murphy KM, Travers P, Walport M, editors. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science, 2007.
- 23.-Waldmann TA. Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annual Review of Medicine* 2006; 57:65–81.
- 24.-Emens LA. Cancer vaccines: on the threshold of success. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 2008; 13(2):295–308.
- 25.-Sioud M. An overview of the immune system and technical advances in tumor antigen discovery and validation. *Methods in Molecular Biology* 2007; 360:277–318.
- 26.-Pazdur MP, Jones JL. Vaccines: an innovative approach to treating cancer. *Journal of Infusion Nursing* 2007;30(3):173-178.
- 27.-Butterfield LH. Cancer vaccines. *British Medical Journal* 2015; 350:h988.
- 28.-Rivoltini L, Canese P, Huber V, et al. Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert Opinion on Biological*

- Therapy* 2005;5(4):463-476.
- 29.-Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(3):204–216.
- 30.-Frazer IH, Lowy DR, Schiller JT. Prevention of cancer through immunization: prospects and challenges for the 21st century. *European Journal of Immunology* 2007; 37(Suppl 1):S148–S155.
- 31.- U.S. Centers for Disease Control and Prevention. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2005; 54(No. RR–16):1–31.
- 32.- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine* 2004; 10(9):909–915.
- 33.- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 2010;363(5):411-422.
- 34.- Berzofsky JA, Wood LV, Terabe M. Cancer vaccines: 21st century approaches to harnessing an ancient modality to fight cancer. *Expert Review of Vaccines* 2013; 12(10):1115-8.
- 35.- Larocca C, Schlom J. Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. *Cancer Journal*, 2011; 17(5):359-71.
- 36.- Parmiani G, Russo V, Marrari A, et al. Universal and stemness-related tumor antigens: potential use in cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(19):5675–5679.
- 37.-Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *The Journal of Immunology* 2007; 178(4):1975–1979.
- 38.-Finn OJ. Cancer immunology. *New England Journal of Medicine* 2008;358(25):2704-2715.
- 39.-Curigliano G, Spitaleri G, Dettori M, et al. Vaccine immunotherapy in breast cancer treatment: promising, but still early. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2007; 7(9):1225–1241.
- 40.-Chiarella P, Massi E, De Robertis M, Signori E, Fazio VM. Adjuvants in vaccines and for immunisation: current trends. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2007; 7(10):1551–1562.
- 41.-Herr HW, Morales A. History of Bacillus Calmette-Guérin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *The Journal of Urology* 2008; 179(1):53–56.
- 42.-Berzofsky JA, Terabe M, Wood LV. Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer. *Seminars in Oncology* 2012; 39(3):348-57.
- 43.-Emens LA. Chemotherapy and tumor immunity: an unexpected collaboration. *Frontiers in Bioscience* 2008; 13:249–257.
- 44.-Garnett-Benson C, Hodge JW, Gameiro SR. Combination regimens of radiation therapy and therapeutic cancer vaccines: mechanisms and opportunities. *Seminars in Radiation Oncology* 2015;2 5(1):46-53.
- 45.-Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 2001; 50(1):3–15.
- 46.-Duan F, Duitama J, Al Seesi S, et al. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *Journal of Experimental Medicine* 2014; 211(11):2231-48.
- 47.-Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015; 520(7549):692-6.
- 48.-Schlom J, Arlen PM, Gulley JL. Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(13):3776–3782.

- 49.-Nag LG, Mrass P, Kinjyo I, Reiner SL, Weninger W. Two-photon imaging of effector T-cell behavior: lessons from a tumor model. *Immunological Reviews* 2008; 221:147–162.
- 50.-Garnett CT, Greiner JW, Tsang KY, et al. TRICOM vector based cancer vaccines. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12(3):351–361.
- 51.-Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6(4):295–307.
- 52.-Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology* 2007; 8(3):239-45.
- 53.-Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New Engl Journal of Medicine* 2012; 366(26):2443-54.
- 54.-Kleponis J, Skelton R, Zheng L. Fueling the engine and releasing the break: combinational therapy of cancer vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Biology and Medicine* 2015; 12(3):201-8.
- 55.-Liu JK. Anti-cancer vaccines - a one-hit wonder? *Yale Journal of Biology and Medicine* 2014; 87(4):481-489.
- 56.-Singh BH, Gulley JL. Therapeutic vaccines as a promising treatment modality against prostate cancer: rationale and recent advances. *Therapeutic Advances in Vaccines* 2014; 2(5):137-148.
- 57.-Freeman-Keller M, Goldman J, Gray J. Vaccine immunotherapy in lung cancer: Clinical experience and future directions. *Pharmacology & Therapeutics* 2015; 153:1-9.
- 58.-Tiriveedhi V, Tucker N, Herndon J, et al. Safety and preliminary evidence of biologic efficacy of a mammaglobin-a DNA vaccine in patients with stable metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2014; 20(23):5964-5975.

+++++\*\*\*\*\*+++++

## NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDA EN COBAYOS CON BIPOLARIS AUSTRALIENSIS

Angel Alonso, Cristina Iovannitti, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico.-  
Div. Alergia – Htal. de Clínicas – Centro de Micología – 2da Cátedra de Microbiología –  
Facultad de Medicina – UBA. SCA. ANCB. -- -

### Introducción.

Los hongos son organismos eucariotas que causan enfermedad en sanos siendo preponderante su agresividad en pacientes inmunocomprometidos. La infección micótica de los senos paranasales fue descrita hace muchos años aunque continúa siendo una patología discutida por su patogénesis, cuadro clínico y tratamiento. <sup>(1-5)</sup>.

En 1791, Plaignaud, describió un caso de sinusitis maxilar fúngica, y en 1893, Mackenzie, hizo lo propio instalando la discusión etiopatogénica. <sup>(6-15)</sup>. Su diagnóstico avanzó gracias al advenimiento de la tomografía computada y la endoscopia. Pocos años antes, Charles Blackley (1873), el pionero de las pruebas cutáneas para la hipersensibilidad a los pólenes describió su propia respuesta asmática después de inhalar un cultivo desecado de *Penicillium notatum*. <sup>(16-22)</sup>.

En 1930, J.G. Hopkins describió el asma producida en un paciente al visitar un campo húmedo y mohoso, que se reprodujo en la prueba desencadenante bronquial con antígenos de *Alternaria* y *Penicillium*. <sup>(23-27)</sup>. En 1941, L. H. Harris y E. S. Pennington, y en 1950, E. Urbach, describieron casos análogos de asma bronquial desencadenada por diferentes especies de hongos anemófilos. En 1971, Mc Carthy y Pepys, observaron que el 10 % de los pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) tenían una secreción nasal muy similar a la bronquial. <sup>(28-30)</sup>. El 40% de los 111 estudiados presentaron radiología de sinusitis maxilar y desarrollaron *Aspergillus fumigatus* en los cultivos del moco nasal.

En 1976, Safirstein, observó que los síntomas nasales en la ABPA se producían al recibir tratamiento con corticoides orales. Ese mismo año, Young, refirió el caso de un nadador de 15 años con sinusitis maxilo-etmoidal, poliposis nasal y proptosis del ojo izquierdo, y descubrió que ésta era debida a la extensión del material fúngico desde el seno hacia la órbita. En 1983, Katzentein, señaló la coexistencia de asma, pólipos nasales, sinusitis y una secreción que llamó "*mucina alérgica*" en los senos afectados, que, era rica en filamentos de mucina, eosinófilos, neutrófilos, cristales de Charcot-Leyden e hifas fúngicas. Desde 1980, los casos descriptos mostraron que los hongos de la familia Dematiaceae, más que el *Aspergillus*, eran los vinculados con la sinusitis alérgica fúngica. En nuestro país, trabajos pioneros de Pablo Negroni, Guido Ruiz Moreno, Alois Bachmann y Lorenzo Giscafré, resaltaron la importancia de los hongos en el desarrollo de diversas reacciones de hipersensibilidad <sup>(29-42-43-44-45)</sup>.

El *Bipolaris australiensis* (Ba), (Teleomorfo: *Cochliobolus sp*) tiene colonias de rápido crecimiento, se encuentra en el ambiente, parasitando vegetales y plantas diversas. Contiene 45 especies, que son subtropicales y tropicales, pero sin embargo, *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* y *B. spicifera* están bien documentadas como patógenos humanos, productoras de enfermedades respiratorias, e incluso, sépticas en los inmunocomprometidos.

En el presente trabajo, se exponen los resultados obtenidos en un proyecto experimental en cobayos que fueron aerosolizados con un extracto glucoproteico de Ba, valorando la respuesta inmune e histopatológica al cabo de 12 semanas, para enfatizar la importancia médica de este hongo anemófilo, tal como se realizó en pacientes portadores de sinusitis alérgica fúngica. <sup>(54)</sup>.

### Materiales y métodos.

Antígeno (Ba) : aspecto de la colonia en agar-glucosa-peptona a 30°: diámetro: 80 mm en una

semana; visualiza un borde blanco con un reverso negro. Microscópicamente, se ven conidias grandes (14-40 x 6-11µm), ovales, de color marrón y pared gruesa, con múltiples tabiques (3 a 5). Se producen en conidióforos geniculados. El extracto se obtuvo siguiendo la metodología establecida por Frugoni/Hansen, conteniendo productos metabólicos y miceliales.

Cuantificación de proteínas y de hexosas : el método de Bradford <sup>(31)</sup> detectó la riqueza proteica mientras que el del indol, que empleó una mezcla de galactosa y manosa, como solución estándar, se leyó en el espectrofotómetro Metrolab a 470 nm de densidad óptica <sup>(47)</sup>. Cobayos : 5 animales adultos de 250-300 g de peso y libres de enfermedad evidente y de experiencias previas, recibieron durante 12 semanas, una cantidad diaria de 8 mg de Ba disueltos en 10 mL de PBS que se aerosolizaron en una campana de vidrio de 6000 cm<sup>3</sup> conectada con un nebulizador ultrasónico durante 1 hora produciendo partículas de 3 µ. Un grupo control de 5 animales fue empleado como control siendo aerosolizado en idénticas condiciones con 10 mL de PBS en otra cámara similar a la anterior virgen de toda experiencia previa. Una hora después de la última aerosolización, cada cobayo fue anestesiado con éter, sangrado a blanco, y los sueros guardados a -20° C. Se disecaron los pulmones, hígado y riñones, se fijaron en formol 10% y se sometieron a los pasos convencionales (alcohol-xilol-parafina-cortes de 6 µ-xilol-alcohol-colorantes) para obtener los preparados histológicos. Los colorantes fueron hematoxilina-eosina, PAS, azul de toluidina 1% y el tricrómico de Mallory. Los signos histopatológicos en los pulmones, se basaron en el hallazgo de bronquiolitis celular, infiltrados intersticiales y granulomas no caseosos, y, la presencia de células gigantes multinucleadas, espumosas intraalveolares, neumonía organizada, bronquiolitis obliterans y fibrosis intersticial. Las microfotografías se tomaron con un microscopio Unic a 100X, 400X y 1000X con una película Agfa Color de 21°Din (100 ASA).

Técnicas Inmunológicas : para valorar la presencia de anticuerpos específicos anti-Ba en los sueros de los cobayos se utilizaron la doble difusión en agar de Ouchterlony <sup>(48)</sup> para precipitinas IgG y el test de Ovary-Bier <sup>(49)</sup> para reagentes del isotipo IgE, tanto en el grupo experimental como en el grupo control <sup>(32-33-34)</sup>.

### **Resultados.**

El método de Bradford reveló una riqueza proteica de 17 mg/mL y el indol detectó carbohidratos en 38 mg/mL, lo cual presupone una composición glucoproteica, que amerita un análisis más pormenorizado empleando columnas de fraccionamiento (Sephadex y DEAE-celulosa). La presencia de anticuerpos específicos IgG e IgE fueron detectados en los sueros de los cobayos del grupo experimental únicamente, a partir de la 5ª semana, revelando el Ouchterlony varias bandas de precipitación, con identidades parciales con antígenos de otros hongos (*Drechslera* y *Aspergillus*), lo cual sugiere una composición antigénica compleja con varios epitopes de distinta conformación, que, parecen tener reactividad cruzada con aquellos. La histopatología de los pulmones, hígado y riñones del grupo control no mostró ninguna alteración a todo lo largo del experimento. El grupo aerosolizado con Ba no exhibió cambios durante las 3 primeras semanas, aunque a partir de la 4ª y hasta la 6ª un exudado apareció en el lumen y una bronquiolitis con linfocitos y plasmocitos en los sacos y tabiques alveolares. Estas lesiones empeoraron con las semanas, y desde la 10ª se observaron granulomas no caseosos diseminados. Histiocitos epitelioides, espumosos y células gigantes se vieron agrupados en los alvéolos. El azul de toluidina no reveló la presencia de células metacromáticas (mastocitos); el PAS mostró espesamiento de las membranas basales de los pulmones y riñones, en estos últimos también infiltrados mononucleares que deberían ser investigados, y el Mallory destacó zonas fibróticas pulmonares en la 12ª semana. (Figs. 1 y 2).

### **Discusión.**

La sinusitis alérgica fúngica es una entidad clínica novel que aqueja a los sujetos atópicos sanos, mientras que, pacientes inmunocomprometidos sufren serias micosis en los senos paranasales y cavidades anexas. Publicaciones previas probaron la participación de varios hongos anemófilos en la patología broncopulmonar; así, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus*

nigricans, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*, *Absidia* sp, entre otros, se vincularon con inflamaciones e infecciones crónicas del árbol respiratorio. Con esta modesta experiencia en cobayos, se trató de valorar la capacidad de Ba para inducir una inflamación crónica de la mucosa respiratoria debida a los componentes metabólicos del hongo (p. ejem. proteasas), y no a la presencia del mismo, tal como, se demostró en la ABPA con las enzimas del *Aspergillus fumigatus*. Estos péptidos, a su vez, se comportan, tanto en los animales como en los humanos, antigénicamente, induciendo una respuesta inmune específica, con anticuerpos, citoquinas e infiltrados celulares macrófago-linfocito dependientes. La síntesis de la IgE podría coadyuvar en el empeoramiento de la inflamación, no obstante no detectarse mastocitos en las histopatologías estudiadas, mientras que, la presencia de la IgG sería la estimuladora de la activación de los macrófagos a través de sus receptores Fcγ, aunque, es esta respuesta inmune muy característica del tipo celular (Gell & Coombs tipo IV). Para abundar información sobre los infiltrados celulares sería necesario el empleo de anticuerpos anti-CD4+ y anti-CD8+, que no fue posible obtener en este momento.-

### **Bibliografía.**

- 1.- Albónico J.F., Tiraboschi I.N. : “La sinusitis fúngica alérgica”. En Temas de Inmunoalergia, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 99-114.
- 2.- Campana N., Alonso A. : “La poliposis endonasal recidivante”. En Temas de Inmunoalergia, tomo 5, Edit. CTM, Buenos Aires, 2004, págs. 57-97.
- 3.- Alonso A., Campana N.R., Albónico J.F., Mouchián K., Kaimen-Maciél I. : Aspectos inflamatorios de la poliposis endonasal recidivante (PENAR). Prensa méd.argent., 2009 ; 96 (4) : 197-205.
- 4.- Allphin A.L. : Allergic fungal sinusitis : problems in diagnosis and treatment. Laryngoscope, 1991; 101 : 815-820.
- 5.- Bent J.P. : Diagnosis of allergic fungal sinusitis. Otolaryngol. Head Neck Surg., 1994 ; 111 : 580-588.
- 6.- Blitzer A. : Fungal infections of the nose and paranasal sinuses. Otolaryngol. Clin. N. Am., 1993; 26 : 1007-1035.
- 7.- Brandwein M. : Histopathology of sinunasal fungal disease. Otolaryngol. Clin. N. Am., 1993 ; 26 : 949-981.
- 8.- Carter K.D. : Ophtalmic manifestations of allergic fungal sinusitis. Am.J.Ophtalmol,1999; 127: 2, 189-195.
- 9.- Clarke S.R. : Allergic fungal sinusitis. J. La State Med. Soc., 1998; 150 : 6, 248-252.
- 10.- De Shazo R.D. : Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. J. Allergy Clin. Immunol., 1995; 96 : 24-35.
- 11.-Ence B.K. : Allergic fungal sinusitis. Am. J. Rhinol., 1990; 4 : 169-173.
- 12.- Folker R.J. : Treatment of allergic fungal sinusitis : a comparison trial of postoperative immunotherapy with specific fungal antigens. Laryngoscope, 1998; 108 : 1623-1626.
- 13.- Gourley D. : Allergic Bipolaris sinusitis. J. Allergy Clin. Immunol., 1990; 85 : 583-591.
- 14.- Katzenstein A.L. : Allergic *Aspergillus* sinusitis. J. Allergy Clin. Immunol., 1983 ; 72 : 89-93. 15.- Mackenzie J.J. : Preliminary report on *Aspergillus* mycosis of the antrum maxillare. J. Hopkins Hospital Bulletin, 1983 ; 4 : 9-10.
- 16.- Mabry R.L. : Immunotherapy for allergic fungal sinusitis : three years' experience. Otolaryngol. Head Neck Surg., 1998; 119 : 6, 648-651.
- 17.- Millar J.W. :Allergic aspergillosis of the maxillary sinuses.Thorax, 1981 ; 36 : 710-715.
- 18.- Mc Carthy D.S. : Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Clin . Allergy, 1971 ; 1: 261-266.
- 19.- Morpeth J.F. : Allergic fungal sinusitis : an update. Annals Allergy, Asthma & Immunol., 1996; 76 : 128-136.
- 20.- Mukherji S.F. : Allergic fungal sinusitis. Radiology, 1998 ; 207, 2, : 217-222.
- 21.- Muntz H. : Allergic fungal sinusitis in children. Otolaryngol. Clin. N.Am., 1996; 29 :185-191.
- 22.- Nash D.R. : Allergic fungal sinusitis. Immunol. Allergy Clin. N. Am., 1998 ; 18 : 695-710. 23.- Plaignaud M. : Observation sur un fungus du sinus maxillaire. J. Chir (Paris),

1791 ;1:111-116.

- 24.- Sánchez Sánchez B. : Allergic fungal sinusitis. *Rev. Alerg. Mex.*, 1999 ; 46 : 5, 145-150.
- 25.- Shubert M.S. : Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998 ; 102 : 387-394.
- 26.- Shubert M.S. : Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis. Treatment and follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998 ; 102 : 395-402.
- 27.- Waxman R. : Allergic aspergillus sinusitis : concepts in diagnosis and treatment. *Laryngoscope*, 1987 ; 97 : 261-266.
- 28.- Shubert M.S. : Medical treatment of allergic fungal sinusitis. *Annals Allergy, Asthma & Immunol.*, 2000; 85 : 90-101
- 29.- Ruiz Moreno G. : *Lecciones de Alergia*. Edit. López & Etchegoyen. Buenos Aires. 1957.
- 30.- Alonso A., Albónico J.F., Tiraboschi N.I., Mouchián K., Pionetti C.H., Irañeta S.G., Kaimen-Maciél I. : Patogenia e inmunoterapia en la sinusitis fúngica alérgica (SAF). *Prensa méd argent.*, 2009 ; 96 (7) : 407-410.
- 31.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976 ; 72: 248-260.
- 32.- Gleich G.J. : The radioallergosorbent test : its present place and future in the practice of allergy. *Advances in Asthma and Allergy*, 1975 ; 2 : 1-9.
- 33.- Berrens L.: Possible indirect binding of IgE in house-dust RAST. *Ann. Allergy*, 1979; 43:(1):38-45.
- 34.- Gleich G.J. : Measurement of IgE in normal and allergic sera by radioimmunoassay. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1971 ; 77 : 690-699.
- 35.- Irañeta S.G., Duschak V., Rodríguez S.M., Alonso A. : Serine proteinases with gelatinolytic activity in an *Aspergillus fumigatus* allergenic extract. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 2002 ; 12 (4) : 257-262.
- 36.- Blackley C.H. : *Experimental research on the causes and nature of catarrhus aestivus*. Balliere, Tindall & Cox Ed., London, 1873 ; 57-58.
- 37.- Hopkins J.G. : Asthma due to a fungus. *JAMA*, 1930; 94 : 6-13.
- 38.- Harris L.H. : Experimental reproduction of respiratory mold allergy. *J. Allergy*, 1941; 12 : 279-286.
- 39.- Pennington E.S. : A study of clinical sensitivity to airborne moulds. *J. Allergy*, 1941; 12 : 388-396.
- 40.- Urbach E. : *Alergia*. Ed. Salvat, Barcelona, 1950 ; 360-372.
- 41.- Hansen K. : *Alergia clínica*. Ed. Salvat, Barcelona. 1950 ; 224.
- 42.- Negroni P., Daglio C. : Flora micológica del aire en la ciudad de La Plata. *Ann. Inst. Inv. Físicas Apl. Patol. Humana*, 1950; 15 : 3-10.
- 43.- Ruiz Moreno G.: *Alergia y hongos*. *Ann. Inst. Inv. Físicas Apl. Patol. Humana*, 1944 ; 6 : 1-7.
- 44.- Bachmann A.E., Ruiz Moreno G.: *Trascendencia de los hongos en la alergia clínica*. *Ann. Inst. Inv. Físicas Apl. Patol. Humana*, 1941; 3 : 189-192.
- 45.- Giscafré L. : Importancia de los hongos en la etiología de las enfermedades alérgicas de la ciudad de Santa Fé. *Prensa méd argent.*, 1943; 25 : 1143-1151.
- 46.- Alonso A., Scavini L.M., Mouchián K., Rodríguez S.M., Irañeta S.G.: Antigenicity of *Penicillium notatum* in animals and in atopic patients. *Allergol Immunopathol.*, 1990; 18 : 301-317.
- 47.- Dische Z. : The indol method. In: *Methods of biochemical analysis*. Ed. Glick. Academic Press. New York, 1958, 2: 200-210.
- 48.- Ouchterlony O.: *Diffusion in gel methods for immunological analysis*. *Progr. Allergy*, 1958; 5: 1-9.
- 49.- Ovary Z. : Immediate reactions of the skin of experimental animals provoked by antigen-antibody interactions. *Progr. Allergy*, 1958 ; 5: 459-470.
- 50.- Fink J.N. : The histopathology of alveolitis. In: *Hypersensitivity pneumonitis*. Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F. (Eds) CV. Mosby Co., New York, 1983; 1085-1089.

- 51.- Pepys J. : Hypersensitivity diseases of the lungs due to fungi and organic dusts. In: Monographs in Allergy. Karger. Basel, 1969; 4: 147-169.
- 52.- Salvaggio J.E. : Hypersensitivity pneumonitis. J. Allergy Clin. Immunol., 1987; 79; 558-566.
- 53.- Alonso A., Caccuri R.L., Scavini M.L., Rodríguez S. M.: Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by *Triatoma infestans* antigens. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1994; 4: 197-202.
- 54.- Alonso A., Mouchián K., Irañeta S.G., Rodríguez S.R., Albónico J.F. : Utilidad de la vacunoterapia con *Bipolaris australiensis* en la sinusitis alérgica fúngica. Prensa méd argent., 2012; 98 : 95-104.

+++++\*\*\*\*\*+++++



## Neumonitis experimental en cobayos por hipersensibilidad a las proteínas del tabaco

Ángel Alonso, Carlos H. Pionetti, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico.  
Div. Alergia, -Hosp de Clínicas, - 2<sup>da</sup> Cátedra de Microbiología, - Fac de Medicina, - UBA, SCA,  
ANCBA

### Summary.

#### **Experimental pneumonitis induced in guinea-pigs by tobacco glycoproteins.**

An experimental model in guinea-pigs of hypersensitivity pneumonitis induced by tobacco glycoproteins was developed. Specific IgG and IgE antibodies were detected by Ouchterlony and the Ovary-Bier's tests. Histopathological studies of the lungs showed interstitial infiltrates of macrophages and LT-cells, cellular bronchiolitis and single non-necrotizing granulomas. The results from this animal model suggest that this hypersensitivity pneumonitis is a typical delayed-type reaction (type IV-Gell& Coombs) due to chronic contact with the heterologous tobacco glycoproteins and reinforced their importance in human respiratory conditions.

+++++\*\*\*\*\*+++++

# INDUCCION DE ORQUITIS AUTOINMUNE EN COBAYOS

Angel Alonso

## Introducción

El concepto de autoinmunidad no implica lo mismo que el de enfermedades autoinmunes, ya que es conocido actualmente, que ciertas respuestas contra antígenos propios no sólo son habituales, sino también necesarias para el normal funcionamiento del sistema inmune (Teoría de la red idiotipo-antiidiotipo de Jerne).

Considerando la patogenia de estas enfermedades como multifactorial, las hipótesis más recientes se centran en 3 aspectos básicos: fallas de los mecanismos de inmunorregulación que controlan la respuesta a los antígenos, susceptibilidad primaria del órgano blanco determinada genéticamente y factores facultativos que aceleran o desencadenan el ataque autoinmune. Para esclarecer estos tópicos y poder así precisar estrategias terapéuticas más sutiles que la actual inmunosupresión inespecífica sistémica, es que se han desarrollado diversos modelos experimentales entre los que se encuentra la orquitis autoinmune experimental (OAE).

A fines del siglo pasado ya era sabido que los espermatozoides eran probadamente inmunogénicos para el huésped autólogo <sup>(1-2)</sup>. Probablemente a causa de ello la OAE, en general inducida en animales por inmunización activa con antígenos testiculares o espermáticos, haya sido uno de los primeros modelos de autoinmunidad descritos, resultando un excelente sistema para el estudio de los trastornos inmunológicos del testículo <sup>(3-4-5)</sup>. Además de los modelos experimentales inducidos, está bien documentada la existencia de orquitis autoinmune espontánea en distintas especies. En perros de raza Beagle existe una línea (A) cuyos machos padecen una alta incidencia de tiroiditis y orquitis con evidencias claras de infertilidad <sup>(6)</sup>. Ambas patologías tienden a coexistir y a su vez están relacionadas a un gen ancestral. Estos perros representan uno de los mejores ejemplos de enfermedades autoinmunes genéticamente determinadas, involucrando las gónadas y otros órganos endocrinos. Otros ejemplos son los ratones T/t<sup>W18</sup> que desarrollan orquitis en un 40% de los casos <sup>(7)</sup> y una cepa de visones que se tornan infértiles después de un período de probada fertilidad (esterilidad secundaria), presentando altos niveles de anticuerpos antiespermáticos con depósitos de IgG y C3 en testículo y una orquiepididimitis severa con detención de la espermatogénesis <sup>(8)</sup>.

La relevancia clínica de la OAE, aunque cuestionada en el pasado, tiene actualmente múltiples evidencias de apoyo. Con relación a la posible patogenia inmune celular de las alteraciones de la espermatogénesis, se han caracterizado las subpoblaciones linfocitarias y los macrófagos de testículos de hombres normales y de pacientes con distintos grados de fertilidad <sup>(9-10)</sup>. Utilizando una técnica de inmunoperoxidasa y anticuerpos monoclonales específicos, se describió la presencia de linfocitos T, con un neto predominio de la subpoblación supresora-citotóxica (CD8+), en la rete testis de los testículos normales. No se observaron estas células en las porciones periféricas del órgano, en donde sí se detectó un número apreciable de monocitos-macrófagos y células HLA-DR+ (antígenos de histocompatibilidad de clase II). Contrariamente a esto, las biopsias testiculares de pacientes subfértiles mostraron células T alrededor de los túbulos seminíferos. En pacientes con oligozoospermia o azoospermia obstructiva, tales células fueron del tipo CD8+ mientras que en los que padecían una obstrucción testicular unilateral o los postvasectomizados, hubo un predominio de la subpoblación CD4 (helper-inductora). Los autores sugieren que esto podría explicar, en parte, la ausencia de anticuerpos espermáticos detectada en el primer grupo y la presencia de altos títulos en el segundo.

En un amplio número de biopsias testiculares de hombres con diagnóstico clínico de azoospermia u oligozoospermia, detectaron un 5% de las mismas con infiltraciones linfocíticas intersticiales que rodeaban túbulos con distintos grados de alteración de la

espermatogénesis <sup>(11-12)</sup>. Comparando las características observadas con las de la OAE, se sugiere que un proceso inmunológico podría estar mediando el efecto deletéreo. Una infiltración similar, peritubular y perivascular, con descamación del epitelio germinal, fibrosis intersticial y engrosamiento de la pared tubular, fue recientemente descrita en un estudio retrospectivo de tejido testicular, tomado de la autopsia de los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) <sup>(13)</sup>.

Con respecto a un posible mecanismo inmune humoral relacionado a patología testicular, se estudiaron numerosas biopsias de pacientes con alguna alteración de la fertilidad, hallando 6 tipos de anomalías en las membranas basales de los túbulos seminíferos <sup>(14)</sup>. Tres de estos tipos fueron positivos cuando se investigó la presencia de IgG o C3 por inmunoperoxidasa. Dichos depósitos inmunes en las membranas basales de los túbulos son interpretados como el resultado de un daño del epitelio germinal mediado por anticuerpos. Es de remarcar, que el estudio de la OAE no sólo puede ser útil para el entendimiento de algunas causas de esterilidad sino también para la evaluación de efectos no deseables de potenciales antígenos a utilizar en inmuncontracepción masculina <sup>(15)</sup>.

Existen distintos tipos de epidídimo-orquitis y aspermatogénesis de probada o probable etiopatogenia inmunológica <sup>(16)</sup>. De todos ellos, uno de los mejor estudiados es la OAE que se obtiene inmunizando cobayos con un homogenado de testículo homólogo (HT) emulsionado con adyuvante completo de Freund (CFA). Su histopatología es compleja <sup>(17)</sup> y consiste en la combinación de algunos de los siguientes hallazgos: cambios degenerativos de las espermátides y exfoliación del epitelio germinal, lesiones infiltrativas mononucleares en el testículo (orquitis, las células inflamatorias invaden los túbulos seminíferos dañando las células germinales y produciendo aspermatogénesis focal), infiltrados con predominio de neutrófilos en los conductillos eferentes, epidídimo (epididimitis) y conducto deferente y aspermatogénesis completa con atrofia tubular severa y fibrosis intersticial (estadio final de la OAE en cobayos).

Los mecanismos patogenéticos que originan estas alteraciones no están, hasta el momento, claramente establecidos, sin embargo existen numerosas evidencias que apoyan, la participación tanto de la inmunidad celular (mediada por células T y no T) como de la inmunidad humoral. El rol de los linfocitos T en la OAE en cobayos se basa en la demostración, en estos animales, de una importante y temprana reacción de hipersensibilidad retardada <sup>(18)</sup> e inhibición de la migración de macrófagos <sup>(19)</sup> contra antígenos espermáticos, como así también en la existencia de una buena correlación temporal entre la linfoproliferación específica y la aparición de la lesión <sup>(20)</sup>. Sin embargo, la evidencia más directa de la participación de mecanismos celulares T dependientes proviene de experimentos de transferencia adoptiva. Lesiones indistinguibles de las observadas en los dadores con OAE fueron transferidas, por vía subalbugínea, a cobayos singéneos, utilizando células provenientes de ganglios linfáticos o exudado peritoneal enriquecidas en linfocitos T <sup>(21)</sup>. Con respecto al rol que desempeñan en la OAE de cobayos, mecanismos mediados por células no T, ha sido descrita la transferencia de lesiones, a través de células B y macrófagos, con una eficiencia y severidad igual <sup>(22)</sup> o mayor <sup>(23)</sup> a la obtenida con células T. El papel de los anticuerpos se demostró con la detección de distintas clases y subclases de Ig(s) antiespermáticas en cobayos con OAE y por la posibilidad de transferir pasivamente este cuadro a través del suero inmune de animales inmunizados activamente <sup>(24)</sup>.

La posibilidad de que ciertos casos de esterilidad masculina de etiología desconocida puedan tener una patogenia inmunológica, ha sido considerada en los últimos años y numerosos investigadores se abocaron a su estudio.

En los sueros de 2.015 varones estériles se halló aglutinación positiva en el 3,3 % de los casos, mientras que en el grupo de control de 416 fértiles los resultados fueron negativos.

En 1.913 casos de oligo y azoospermia, también se halló un 3% de sueros con aglutininas, mientras que otros describen un 14% sobre un grupo de 489 enfermos <sup>(25)</sup>.

Las variantes de aglutinación observadas fueron cabeza-cabeza, cabeza-cola, y cola-cola, con predominio de la primera y la tercera. Al emplear otras técnicas más discriminativas, tales como la fijación del complemento, la difusión en gel de agar, el consumo de antiglobulina y

la prueba cutánea con espermatozoides móviles ultrasonados como antígeno, se halló un total del 18% de positividad, preferentemente lograda mediante el empleo de esta última técnica.

La histopatología en todos los casos era francamente positiva en el sentido de la orquitis con activa destrucción de los tubos seminíferos y pasaje de las células germinales al intersticio tubular.

Los controles constituidos por hombres fértiles, niños y portadores de endocrinopatías acompañadas de atrofia o falta de desarrollo del epitelio germinal, fueron constantemente negativos. Se ha esgrimido la hipótesis de que la extravasación de las células germinales al intersticio -provocada por la interacción de agentes inflamatorios de múltiple etiología- y su posterior reabsorción, pudiera poner en marcha el mecanismo de autoinmunización. Estos hallazgos clínicos movieron a los investigadores a realizar experiencias en animales y en humanos con el propósito de evaluar los presuntos mecanismos inmunobiológicos intervinientes y su posible relación con la clínica y la histopatología descriptas.

Desde comienzos de siglo se señaló la propiedad de un antisuero "citotóxico" para inmovilizar espermatozoides normales in vitro<sup>(26)</sup>. La supresión de la espermatogénesis inducida en forma inmunológica fue lograda primeramente en cobayos, luego en ratas y en cepas puras de ratones, y por último, en hombres<sup>(27)</sup>.

El agente capaz de producir lesión y que se halla presente en el homogenado testicular empleado como antígeno, así como, en otras 2 fracciones proteicas precipitadas, fue identificado como un complejo polisacárido-polipéptido.

La respuesta testicular del cobayo fue inducida también con esperma homóloga y espermatozoides epididimarios, y por ello se ha concentrado la atención sobre el acrosoma del espermatozoide y también de las espermátidas que podrían ser los receptáculos de los antígenos espermatogénicos<sup>(28-29-30)</sup>.

La lesión citológica germinal puede estar acompañada por anticuerpos circulantes de bajo título, detectables por fijación del complemento, P.C.A., Schultz-Dale, doble difusión agar, inmunolectroforesis y consumo de antiglobulinas mientras que los anticuerpos de tipo celular fijo serían puestos de manifiesto por la prueba cutánea.

También es conocido el hecho de que el homogenado testicular o los espermatozoides son capaces de inducir la formación de anticuerpos circulantes en sensibilizaciones heterólogas. Dado que el homogenado testicular es una mezcla compleja de sustancias, y considerando que además de ser el antígeno testicular más empleado, no existe información detallada acerca de las propiedades del inmunosuero antitestículo, se consideró de interés realizar la siguiente experiencia:

- 1.- reproducir una OAE en un lote de cobayos valorando la síntesis de anticuerpos específicos y de células mononucleares ;
- 2.- evaluar la reactividad serológica y la inmunoreactividad cruzada de los inmunosueros antitestículo heterólogo y homólogo frente a los diversos antígenos testiculares;
- 3.- considerar la respuesta histopatológica ante la inyección intratesticular de los antisueros y de las células inmunológicamente competentes, y ,
- 4.- valorar en otro lote de cobayos la actividad del **tacrolimus** en la OAE ante los mismos agentes agresores (inmunosueros y células) para el órgano de choque.

## Materiales.

### **A. Antígenos**

**1) Homogeneizados de órganos:** cobayos adultos y sanos cuyo peso oscilaba entre 300 y 350 grs., fueron sangrados a blanco por sección carotídea bilateral e inmediatamente castrados, nefrectomizados y hepatectomizados. Los testículos fueron liberados de su albugínea, pesados y luego cortados en trozos pequeños con tijeras. Esta papilla fue colocada en un vaso de homogeneizador tipo Potter al cual se le agregó solución fisiológica 0.9% en la proporción de 1:1 de peso en volumen.

El vaso fue sumergido en un recipiente que contenía hielo granizado lo cual permitía mantener la mezcla alrededor de 0° C. En estas condiciones fue sometida a la homogeneización a razón de 2000 r.p.m. durante 10 minutos, y luego guardada en

congelador a - 20° C hasta el momento de la sensibilización.

Cuando fue utilizado para las pruebas serológicas como antígeno, el preparado anterior fue congelado y descongelado 12 a 14 veces, y luego centrifugado a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente y usado el sobrenadante.

Los homogeneizados de riñón e hígado empleados únicamente en las pruebas serológicas fueron preparados siguiendo el mismo esquema que el descrito para el testículo.

**2) Células germinales:** obtenidas a partir del primer triturado de testículo, siendo este suspendido en solución fisiológica 0.9% en volumen variable y luego filtrado por gasa triple. La suspensión así obtenida fue centrifugada con la misma solución 3 veces a razón de 800 1000 r.p.m. durante 10 minutos a la temperatura ambiente, desechándose el sobrenadante de la última y el pellet obtenido, se suspendió en un pequeño volumen de dicha solución. Se hizo un recuento en cámara cuantaglobulos (Thoma), y posteriormente, se diluyó hasta tener una concentración de 50.000.000 de células por ml. Ulteriormente, fue ultrasonada durante 30 minutos a 4°C a razón de 20.000 ciclos por segundo.

**3) Espermatozoides:** obtenidos por punción, sección y expresión manual o mecánica de epidídimos de cobayo in vivo, bajo narcosis. El procesado posterior de los mismos fue similar al aplicado a las células germinales, es decir, centrifugación, resuspensión, recuento (la concentración final fue también de 50.000.000 por ml.) y ultrasonado. Así fueron usados como antígenos en las pruebas serológicas.

**4) Fracción 1:** obtenida del testículo al que se le había quitado su albugínea, y que fue tratado con ácido acético 0,1 N en la proporción 1:1 de peso en volumen en un homogeneizador Virtis, hasta completa homogeneización. Posteriormente, se guardó toda la noche en heladera a 4° C. Luego fue centrifugado y el sedimento fue lavado con ácido acético 0,1 N y dejado nuevamente hasta el día siguiente en iguales condiciones. Se centrifugó otra vez y el líquido sobrenadante se agregó al obtenido anteriormente. Sulfato de amonio sólido fue agregado al pool guardado en baño frío hasta obtener 30% de saturación.

Se dejó toda la noche precipitando y al día siguiente fue centrifugado y el sedimento lavado con sulfato de amonio al 30% de saturación. A la mezcla de los 2 sobrenadantes, también en baño frío, le agregamos más sulfato de amonio sólido hasta obtener una concentración del 70%. La mezcla fue centrifugada luego de permanecer toda la noche en la heladera a 4° C. El sedimento fue disuelto en agua destilada y dializado primeramente contra agua corriente a 15° - 20° C, y luego, contra agua destilada a 5° C. El contenido del tubo de diálisis fue liberado a una pequeña cantidad del material no disuelto por centrifugación y luego liofilizado.

**5) Fracción 2:** es el precipitado que resulta de agregar a 100 mg. de fracción 1, disueltos en 20 ml. de agua destilada en un baño frío, 16 ml. de una solución de ácido tricloreacético al 20%.

**6) Fracciones acrosómicas:** obtenidas a partir de una suspensión de espermatozoides de cobayo en solución fisiológica, a la que se le agregó un volumen igual de NaOH N/10 dejándose durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó y se separó el sobrenadante; éste tiene en solución el acrosomatotal, y el precipitado el remanente de los espermatozoides.

El sobrenadante se llevó a pH 5,8 con ácido acético, y se le agregaron en frío 2 volúmenes de alcohol. Se dejó precipitando a 4° C durante toda la noche y luego se centrifugó. El precipitado es el acrosoma insoluble o fraccióninsoluble del acrosoma y el sobrenadante, la fracciónsoluble.

El precipitado se suspendió en agua, y lo mismo que el sobrenadante, se dializaron contra agua corriente y contra agua destilada; finalmente se liofilizaron.

**7) Mucopolisacárido testicular:** el material soluble en ácido tricloroacético obtenido con la fracción 2, fue llevado a pH 4,5 por el agregado de HCl, y posteriormente, purificado por agitación mecánica repetida con una mezcla de cloroformo y alcohol butílico en partes iguales. Se filtró a través del papel de filtro humedecido. Se liofilizó.

**8) Mucopolisacárido conectivo:** a gonadas de cobayos se les disecaron separadamente la albugínea y la masa glandular. El material fresco se liofilizó, y luego deslipidizó con

acetona-éter. Una alícuota de 3 g. de extracto acetónico de albugínea y 5 g. de extracto acetónico de masa glandular, fueron suspendidos en buffer acetato 0,1 M, pH 5,5 (20 ml/g de polvo) conteniendo clorhidrato de cisteína 0,005 M y versenato disódico 0,005 M. Se agregó papaína cristalizada (2mg/g de extracto acetónico) y la mezcla fue incubada 24 hs. a 60°C.

Luego se trató con NaOH 0,5 M y la mezcla fue dializada contra agua corriente 24 hs. a temperatura ambiente, y otras 24 hs. contra agua destilada. En esta etapa se determinó la relación TS/UA. La muestra dializada fue incubada con tripsina cristalina (2,5 mg/g. de proteína) en tubo de celofán, y dializada simultáneamente contra búffer fosfato 0,1 M, pH 7,8 - 8 a 37° C por 72 hs. Se determinó nuevamente la relación TS/UA. El remanente proteico se eliminó con C10<sub>4</sub>H 4N a 0°C. El precipitado fue lavado repetidas veces con C10<sub>4</sub>H 0,1N. Se estudió en el sobrenadante la relación TS/UA. Los sobrenadantes combinados fueron neutralizados con OHK y luego de dejar reposar por más de 1 hora el precipitado fue separado por centrifugación.

**9) Hialuronidasa:** obtenida como la fracción 1, con ácido acético, y luego con sulfato de amonio entre el 30% y el 70% de saturación. El sedimento obtenido fue solubilizado en agua destilada y dializado. Este material fue llevado a pH 6, se agitó mecánicamente durante 15 min. a 4° C con cloroformo 2:1 V/V. Se filtró y la solución se dializó contra agua destilada durante 24 hs. Se liofilizó. Se efectuó una primera purificación por columna de Amberlita XE 64 - ICR 50 de las siguientes dimensiones: 0.9 cm. por 37 cm. La columna fue equilibrada con buffer de fosfato pH 6, 0.1 M. El buffer de siembra fue de fosfato 0.1 M a pH 6. Se eluyó en buffer de fosfato 0.3 M a pH 7.7. La velocidad de flujo fue de 7 ml. por hora. A los 20 ml. empezó a pasar la proteína inactiva. Entre los 20 y 40 ml. pasó completamente. La hialuronidasa activa pasó entre los 160 y 180 ml. La fracción activa se dializó contra agua destilada y se liofilizó.

La segunda purificación se realizó con el polvo obtenido en la purificación anterior disolviéndolo en buffer de Tris 0.05 M y C1Na 0.1 M pH 7.2 en una columna de las mismas dimensiones que la anterior y equilibrada con buffer de Tris pH 7.2.

La elución se hizo con buffer de Tris pH 7.2 y con un gradiente de concentración del C1Na entre 0.05 y 0.15 M y a 4°C.

La parte inactiva pasó con el buffer de concentración 0.05 M mientras que la parte activa se eluyó con la concentración de 0.15 M. Se dializó y liofilizó.

**10) Glucoproteína testicular:** obtenida a partir de las células germinales del testículo de cobayo, separadas según técnica descrita, se pesaron en estado fresco, se desengrasaron y desecaron con acetona en la proporción de 100 ml. por cada 200 mg. de material fresco.

Se agitó y se centrifugó haciendo 3 cambios de acetona-éter 1:1, se centrifugó, se lavó con éter agitando y filtrando con buffer. El material obtenido se colocó en el desecador al vacío medio día. Luego se obtuvo el peso seco. Las células desecadas se trataron con NaOH 0,5 N en la proporción de 50 ml. por cada 75 a 200 mg. de células secas. Se agitó a 4° C durante 45 minutos. Se centrifugó. Se eliminó el precipitado y el sobrenadante, se neutralizó con ácido acético 8,75 M. Se agregaron 3 ml. de ácido perclórico al 17%. Se refrigeró a 4° C durante 1 hora. Se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos y el sobrenadante se dializó 16 horas contra agua corriente y después contra agua destilada.

Luego se hizo una precipitación con ácido fosfotúngstico al 5% en HCl 2N. Dos ml. de este reactivo se agregaron por cada 10 ml. del sobrenadante. Se dejó reposar durante 15 minutos. Se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 30 minutos. El precipitado se disolvió en agua y se dializó contra agua corriente y contra agua destilada; luego se liofilizó.

**11) Glucoproteína sérica:** 500 ml. de suero de cobayo fueron diluidos con igual volumen de agua y 500 ml. de una solución de ácido perclórico 1.8 M (o de ácido sulfosalicílico 0.6 M) fueron agregados mientras se agitaba. Se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 5 dentro de los 2 a 5 minutos después de la precipitación proteica. El filtrado fue dializado hasta estar libre de ácido y las glucoproteínas fueron precipitadas por saturación del dializado con sulfato de amonio a pH 4. Lo obtenido fue dializado exhaustivamente contra agua destilada y luego liofilizado. Aproximadamente 20 mg. del producto fueron obtenidos

por cada 100 ml. del suero empleado.

**12) Glucoproteína conectiva:** se corta el material testicular lo más pequeño posible y se lava con agua destilada hasta que negativice la reacción de la bencidina. Se desengrasa con acetona (3 veces por día durante 3 días) y se extraen lípidos con soxhlet con benceno-acetona (1:1) durante 3 horas. Se disgrega en un mortero y se toma 1 gramo de T.S.D. al que se agregan 10 mg. de pepsina, incubándose a 37<sup>a</sup> C durante 3 días.

Se filtra y se liofiliza agregando timol u octanol como conservador.

**13) Suero total de cobayos normales:** obtenido de las sangrías de dichos animales, fue empleado como tal en las reacciones controles y en la sensibilización heteróloga de conejos. Una vez obtenido dicho suero, por separación de la sangre depositada en las cápsulas de Petri, fue centrifugado y el límpido sobrenadante liofilizado. Al ser empleado fue reconstituido con agua destilada en la relación peso/volumen establecida previamente. La separación en sus fracciones albúmina y globulina se hizo por precipitación salina.

Así, un volumen determinado de suero total fue llevado al doble con solución fisiológica. Luego se le agregó sulfato de amonio 42,6 gr. por ciento en un volumen doble al volumen total anterior. Se hizo lentamente gota a gota, en baño de hielo (0° - 4° C) con agitador y baja velocidad. Al final se hizo muy lentamente. Luego se centrifugó todo a 3000 r.p.m. durante 20 minutos siempre a 0° - 4° C hasta que el sobrenadante quedó límpido; éste contenía la albúmina y, el precipitado las globulinas.

El precipitado fue diluido en agua destilada y luego dializado contra buffer P04 HNa2 - P04 H2 Na, 0,15 M a pH 7,2.

Fue cambiado tantas veces como se creyó necesario para eliminar el sulfato de amonio. Se controló con el reactivo de Nessler.

Se logró su total eliminación en un lapso de 3 - 4 días; se centrifugó como antes y se empleó el sobrenadante con las globulinas. Se dosaron y liofilizaron a posteriori.

Al sobrenadante que contenía la albúmina se agregó sulfato de amonio en droga hasta obtener una solución 3M de dicha sal, para ello se midió el volumen y dado que el peso molecular de dicha sal es 132,14 se multiplicó por 3 = 396,42 por mil; una parte proporcional para el volumen del sobrenadante empleado. Se trabajó en iguales condiciones, es decir, goteo lento, etc.

Se dejó reposar. Se llevó a pH 4,5 con ácido acético puro; unas pocas gotas fueron suficientes. Se dejó en la heladera 24 hs. para que la albúmina fuera precipitando. Se centrifugó. El sobrenadante que deberá ser límpido se tirará puesto que la albúmina queda en el residuo.

Agregar un poco de agua destilada para diluirlo y dializar contra agua destilada pH 7 (que se puede lograr con un poco de NaOH agregado a la misma) hasta que no haya más sulfato de amonio. Dosar y liofilizar.

Para el dosaje de las proteínas se utilizó la siguiente técnica: en tubos de centrífuga comunes se colocan: en el testigo: 9,75 ml de NaOH 0% y 0,25 ml. de S04Cu 20%, en la muestra: 9,65 ml de NaOH 0% y 0,25 ml. de S04Cu 20% y 0,10 ml. de proteína.

Agitar con energía. Dejar en reposo durante 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a 2000 r.p.m. Leer en fotocolorímetro (Crudo Caamaño. Factor 2,4,  $\lambda = 520$ ) Ejemplo: Muestra  $130.130 \times 2,4 = 312 / 100 = 3,12 \text{ g } \%$  de globulina o albúmina por cien ml. de ese material. Se realizaron posteriormente corridas electroforéticas de los materiales obtenidos.

## **B) Antisueros**

**1) Heterólogo** (suero de conejo antihomogenado testicular de cobayo).

Conejos sanos y adultos se inyectaron con el homogenado testicular preparado de la manera ya descripta siguiendo este esquema de inmunización; la primera inyección se hizo por vía intradérmica con Adyuvante de Freund completo en la proporción de partes iguales de ambos (1:1). Se inyectó un volumen total de 2 ml. de la mezcla repartidos en 10 habones de 0,20 ml. cada uno en el dorso del animal convenientemente rasurado. Previamente a esta inyección cada conejo fue sangrado de la vena marginal de la oreja extrayéndosele 10 ml. de sangre. El suero obtenido fue congelado y se empleó como control normal en las testificaciones posteriores.

La segunda inyección se realizó a los 15 días, siguiendo una técnica similar a la anterior, pero sin el agregado del Adyuvante de Freund a la mezcla.

Siete días después, se practicó una tercera inyección semejante en todo a la segunda. Una semana más tarde, una cuarta, con las características de la primera, es decir, con Adyuvante de Freund. Quince días después, la quinta inyección, siempre intradérmica y sin el adyuvante. Siete días más tarde, una sexta similar a la anterior.

Se totalizaron así casi 60 días de inmunización. Diez días después de la última, se hizo una más, esta vez por vía endovenosa -el antígeno fue congelado y descongelado repetidas veces (12-14) y luego centrifugado con el propósito de eliminar al máximo las partículas de la suspensión.

Se inoculó por vía intraperitoneal, media hora antes de este "booster", un antihistamínico de síntesis (clorfeniramina) a razón de 1 mg/Kg. de peso del animal, con el propósito de evitar fenómenos secundarios a la inyección del antígeno por vía venosa. Cuarenta y ocho horas después de esta inoculación el animal fue sangrado a blanco, bajo narcosis, por canulación carotídea unilateral. El suero obtenido fue fraccionado en varios envases equivolumétricamente, calentados algunos de ellos a 56° C durante 30 minutos (con el fin de inactivar su complemento) y guardado a -20° C hasta su empleo en las pruebas serológicas.

**2) Homólogo** (suero de cobayo antihomogenado testicular de cobayo). El esquema de inmunización fue diferente en este caso.

Cobayos sanos y adultos (300 g. de peso) fueron rasurados convenientemente en su dorso e inyectados con una mezcla de homogenado testicular y adyuvante de Freund en partes iguales (1:1). Se inoculó 1 ml. a cada bicho, volumen que se distribuyó en 10 habones de 0,1 ml. cada uno, que se hicieron intradérmicamente.

Cuarenta a cuarenta y cinco días después estos bichos se sangraron a blanco por sección carotídea bilateral (bajo narcosis), y el suero obtenido se trató técnicamente como el heterólogo, para su conservación y posterior testificación.

**3) Heterólogo antiproteínas séricas de cobayo** (suero de conejo antisuero total de cobayo normal).

Conejos adultos y sanos se inmunizaron repetidamente con suero total de cobayo normal. Se inyectaron semanalmente por vía intradérmica con 1 ml. de dicho suero, distribuido convenientemente en habones de 0,20 ml. cada uno. No se empleó adyuvante de Freund. A las 8 semanas los animales se sangraron a blanco, según la técnica descrita, y el suero obtenido se guardó a -20° C para su empleo ulterior.

**4) Complemento:** (suero fresco de cobayos normales). Obtenido de las sangrías de los animales cuando estos eran castrados; fue liofilizado y fraccionado en ampollas, cuyo contenido se llevó al volumen inicial para su utilización. Su título fue verificado por fijación del complemento.

**5) Suero HETEROLOGO Antihomogenado de Testículo, ABSORBIDO con distintos antígenos testiculares y de otros órganos:** con el propósito de precisar la especificidad de las reacciones se absorbió dicho suero con: homogeneizados de testículo, hígado y riñón liofilizados, células germinales y espermatozoides enteros.

Se desarrolló la siguiente técnica de absorción: con antígenos liofilizados se emplearon 100 mg. por cada mililitro del antisuero; para las células germinales y espermatozoides se preparó un pellet que contenía de 100 a 200 millones de células por mililitro.

En ambos casos, se incubaron durante 1 hora a 37° C en baño de María, y posteriormente se guardaron en heladera (4° C) durante toda la noche. A la mañana siguiente, se centrifugaron durante 10 minutos a 600-800 r. p. m. y el sobrenadante fue empleado en las reacciones serológicas como suero absorbido.

**6) Suero homólogo antihomogenado de testículo absorbido con distintos antígenos testiculares y de otros órganos:** se procedió de idéntica manera que con el suero heterólogo para la obtención de este suero absorbido.

**7) Tacrolimus (FK-506)** o análogo de la ciclosporina es un macrólido con una potente actividad inmunomoduladora tanto "in vitro" como "in vivo" que inhibe la activación de los linfocitos T al unirse a una proteína intracelular, la FKBP-12, formando un complejo-calcio-



calmodulina y calcineurina y que inhibe la actividad fosfatasa de esta última. Este efecto previene la desfosforilación y translocación del factor nuclear de los LT activados (FN-AT), componente nuclear que inicia la transcripción génica de la síntesis de citoquinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). También inhibe la liberación de mediadores preformados de los mastocitos y basófilos y regula negativamente la expresión del receptor FcR- $\epsilon$ -I de las células de Langerhans.

### **C) Obtención de células de ganglio linfático de animal normal y de animal sensibilizado con homogenado testicular:**

Los cobayos normales que se emplearon en las sangrías para obtener suero fresco de cobayo, fueron disecados en la zona cervical posterior, preferentemente, y los ganglios linfáticos de dicha región extraídos por completo.

Similar procedimiento se aplicó en cobayos sensibilizados con homogenado testicular -ver obtención del suero homólogo- extrayéndose los ganglios 10 días después de la inmunización subcutánea.

En ambos casos, los ganglios fueron cortados en pequeños trozos, desmenuzándose suavemente con pinza y tijera, los tractos fibrosos del tejido para permitir una mejor liberación de células en medio 199 con sales de Hank.

Se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con dicha solución a 600 r.p.m., resuspendiendo el pellet obtenido hasta lograr una concentración de 50.000.000 de células por mililitro, lo cual se verificó con cámara cuentaglobulos del tipo Neubauer.

Se guardaron a 4° C hasta su empleo en inyecciones intratesticulares, tal como se describe en Métodos.

### **Métodos.**

Como técnicas inmunoserológicas estándar se emplearon la fijación del complemento y la doble difusión en agar.

La fijación del complemento se desarrolló sobre la base de la técnica descrita por Casals, con las innovaciones introducidas por Osler con lectura fotocolorimétrica evaluando el 50% de hemólisis.

Las concentraciones de los antígenos empleados en esta técnica fueron las siguientes:

Homogeneizados de testículo, riñón e hígado, cada uno de ellos, en una dilución de 1:800, en solución fisiológica 9% o, pH 7,2;

Células germinales y espermatozoides, a razón de 50 millones de células por mililitro;

Fracciones 1 y 2, fracciones acrosómicas y el remanente, a razón de 2 mg/ml.;

Mucopolisacárido testicular: 1 mg/ml;

Mucopolisacárido conectivo: 2,5 mg/ml;

Hialuronidasa: 1 mg/ml;

Glucoproteínas testicular, conectiva y sérica, a razón de 2 mg/ml, y

Albúmina y globulinas de cobayo, a razón de 3 mg/ml de cada una.

Los antisueros se emplearon en las diluciones progresivas usualmente realizadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ... 1/4096). Para precisar mejor el título correspondiente, en algunos casos, se repitió la técnica con cifras decimales (1/400, 1/450, 1/500, 1/550, etc.).

La doble difusión en agar se realizó en cápsulas de Petri, según descripción de Ouchterlony o en portaobjetos según variante de Crowle.

Las concentraciones de los antígenos empleados en esta técnica fueron las siguientes:

Homogeneizados de testículo, riñón e hígado, en una dilución de 1:8, en solución fisiológica 9% o , pH 7,2;

Células germinales y espermatozoides, a razón de 50 millones de células por mililitro;

Fracciones 1 y 2, a razón de 30 mg/ml;

Fracciones acrosómicas: 20 mg/ml;

Remanente: 45 mg/ml;

Mucopolisacárido testicular: 48 mg/ml;

Mucopolisacárido conectivo: 50 mg/ml;

Hialuronidasa: 25 mg/ml;

Glucoproteínas sérica y conectiva: 20 mg/ml;  
Glucoproteína testicular: 24 mg/ml, y  
Albumina y globulinas de cobayo: 20 mg/ml de cada una.

El orificio central de la placa de agar fue llenado con 0,2 ml de suero sin diluir, y los orificios periféricos, colocados a 1,5 cm de distancia del primero, se llenaron con 0,2 ml de las diferentes concentraciones de los antígenos señalados más arriba.

La lectura final se realizó a los 7 días, disponiéndose el registro fotográfico de las placas más ilustrativas. Fueron lavadas con solución fisiológica repetidas veces, y luego, con solución de lavado de ácido acético para electroforesis, que al mismo tiempo, resaltaba las bandas de precipitación y facilitaba su fotografía.

Con la microtécnica, la lectura era más precoz (24-48 hs.) y el volumen empleado de sueros y antígenos mejor (0,05-0,07 ml); el resto del procedimiento era similar. Se limitó su empleo para aquellos casos en que la cantidad de antígeno era exigua.

La inyección intratesticular de los sueros heterólogo, homólogo y normales de cobayo y conejo, se practicó en forma aséptica, a través de la piel, en la zona ecuatorial de la gónada del cobayo.

Se utilizó siempre una sola glándula por animal, dejando la otra como control. El volumen del suero inyectado fue de 0,10 ml, empleándose jeringa de tuberculina y agujas 10/5.

Los tiempos entre la inyección intratesticular de los sueros respectivos, y la obtención del material para su estudio histológico fueron los siguientes: 48 y 96 horas; 7, 15, 25 y 37 días.

La inyección intratesticular fue siempre única, o sea, que no se hicieron reinyecciones.

Los testículos de cobayo fueron fijados en líquido de Bouin, incluidos en parafina y cortados, en secciones de 6  $\mu$ , en forma seriada para finalmente colorearlos con hematoxilina-eosina.

La observación microscópica se realizó con un fotomicroscopio Carl Zeiss y los registros fotográficos se practicaron con película Agfacolor 18° Din.

Como controles también se utilizaron cobayos a los cuales se les inyectó en forma idéntica, solución fisiológica 9‰, pH 7,2 y otro grupo de animales, a los cuales se les realizó una punción testicular con la misma aguja sin inyectar ni aspirar, para evaluar las acciones inespecíficas debidas al traumatismo físico.

En estos dos casos los tiempos fueron los siguientes: 48 y 96 horas; 15, 25 y 37 días. La inyección intratesticular de células de ganglio de animal normal y de ganglio de animal inmunizado con homogenado de testículo, se realizó siguiendo las pautas descritas para la inyección de sueros.

El volumen de 0,10 ml. inyectado correspondía a una suspensión madre establecida en 50 millones de células ganglionares por mililitro. Los tiempos de extracción del órgano inyectado fueron los siguientes: 48 y 96 horas; 10, 20 y 30 días.

El tratamiento del órgano para su estudio histológico, fue similar al señalado anteriormente.

En la inyección de sueros, en los controles, y en la inyección de células, tanto en los recibieron tacrolimus como en los que no lo hicieron, se emplearon un total de 36 cobayos, albinos, de un peso aproximado a los 300 gramos (16 para los sueros, 8 para los controles y 12 para las células).

#### **Administración del Tacrolimus:**

El fármaco fue disuelto en solución fisiológica estéril pH 7,2 a razón de 0,5 mg/ml de solución. Considerando que los cobayos pesaban entre 300 y 400 gramos, se administraron diariamente per-os con jeringa a la manera de una mamadera 1 ml de una solución que le aportaba 0,030 mg del fármaco activo por día equiparando la dosis de 0,100 mg/Kg peso/día que se indican para los seres humanos.

Como el tacrolimus no inhibió la síntesis de anticuerpos antiespermáticos específicos se analizaron sus efectos a nivel histopatológico en testículos de cobayo en iguales tiempos que aquellos establecidos para valorar los efectos de los antisueros heterólogo y homólogo y de las células inflamatorias provenientes de los ganglios de animales inmunizados.

El análisis de los resultados expuestos en las Tablas 1 a 5, donde se consignó la reactividad

serológica por fijación del complemento de los sueros heterólogo, homólogo y antiproteínas séricas de cobayo, frente a antígenos testiculares, de otros órganos y a proteínas séricas, permite extraer las siguientes conclusiones :

a): comparados con los resultados negativos hallados con los sueros normales, tanto de cobayo como de conejo, empleados como controles, el suero heterólogo antihomogenado testicular reveló un *elevado título de anticuerpos antitesticulares*, 8 veces superior al detectado en el suero homólogo, al ser testificados frente a su propio antígeno ;

b): lo mismo ocurrió cuando los homogenados de riñón e hígado, la fracción 1, las células germinales, los espermatozoides y el acrosoma soluble fueron testificados frente a los 2 inmunosueros mencionados ;

c): resultados negativos se obtuvieron con antígenos más purificados como la fracción 2, el acrosoma total y el insoluble, el remanente, los mucopolisacáridos testicular y conectivo, la hialuronidasa, las glucoproteínas testicular, conectiva y sérica, así como, la albúmina y las globulinas, al ser testificados con los antisueros heterólogo y homólogo;

d): los resultados conseguidos con albúmina, globulinas y la fracción 2, no son de fácil explicación, mientras que los obtenidos con los acrosomas total e insoluble y con el remanente, pueden deberse a su escasa solubilidad;

e): el suero de conejo anti-proteínas séricas de cobayo, sólo reveló una débil reacción frente a los homogenados de testículo, de riñón, de hígado y a la fracción 1, y fue negativo con los antígenos restantes, incluyendo, curiosamente a la albúmina y a las globulinas.

Los sueros heterólogo y homólogo fueron absorbidos con varios antígenos testiculares y de otros órganos para evaluar la especificidad de las reacciones obtenidas.

En las Tablas 6 a 9, se expuso la reactividad serológica de los inmunosueros mediante la técnica de Ouchterlony. Un mayor número de líneas de precipitación se obtuvo con el suero heterólogo que con el homólogo. Con éste, sólo 2 líneas, con similitud entre ambas, fueron vistas con el homogenado testicular y la fracción 1. Con todos los otros antígenos los resultados fueron negativos.

El suero heterólogo reaccionó con 7 líneas de precipitación contra el homogenado testicular, mientras que sólo 3 fueron visibles con los homogenados de riñón e hígado, las células germinales y las globulinas. Dos líneas de precipitación produjeron las fracciones 1 y 2 y los espermatozoides. Con una sola línea, reaccionaron las 3 fracciones acrosómicas, el mucopolisacárido y la glucoproteína testiculares, la hialuronidasa y la albúmina. Resultados negativos se obtuvieron con el remanente, el mucopolisacárido conectivo y las glucoproteínas sérica y conectiva. **(Fotos n° 6,7 y 8).**

Las líneas de precipitación obtenidas con el homogenado testicular, se separan en 2 grupos : uno cercano al orificio periférico del antígeno y que eran 3 ó 4 líneas delgadas con parcial identidad con las globulinas, y otro, adyacente al hoyo central del antisuero, compuesto por 3 ó 4 líneas curvas y gruesas con identidad con las 2 líneas externas de las células germinales **(Foto n° 1)**. Entre los otros antígenos, la fracción 1 mostró 2 líneas frente al antisuero heterólogo, una recta cerca de la siembra del antígeno, y otra curva próxima al orificio central que reveló identidad con la línea externa de los espermatozoides y con la del acrosoma total.

La fracción 2 reveló 2 líneas curvas diferentes; la cercana al hoyo central que contenía al antisuero era pequeña y gruesa, y la segunda, ubicada equidistantemente era larga, fina y curva. Las células germinales mostraron 3 líneas de precipitación con el homogenado testicular y la línea sobrante tenía completa identidad con la más gruesa de los espermatozoides. Estos revelaron 2 líneas curvas frente al suero heterólogo con identidad con una de la fracción 1 y con otra de las células germinales.

El acrosoma total mostró una sola banda con identidad con la línea externa de los espermatozoides **(Foto n° 2)**.

Los homogenados de riñón e hígado mostraron 3 líneas cada uno siendo las primeras muy finas excepto una cercana al orificio central que aparecía gruesa y poco definida y las segundas más claras, gruesas y rectas. **(Foto n° 3)**.

La glucoproteína y el mucopolisacárido testiculares y la hialuronidasa revelaron una sola

banda cada uno de ellos frente al antisuero heterólogo; eran claras y definidas sin identidad entre sí.

La albúmina mostraba una sola línea y las globulinas 3, las que tenían identidad parcial con las líneas externas obtenidas por el homogenado testicular.

El suero heterólogo absorbido con varios antígenos testiculares y de otros órganos, fue testificado con homogenados de testículo, de riñón y de hígado, al igual que contra células germinales y espermatozoides. Los resultados agrupados en la **Tabla 9** señalan una disminución del número de bandas de precipitación inicialmente obtenido; el resultado fue totalmente negativo cuando el suero heterólogo se absorbió con el homogenado testicular. El suero homólogo sólo se absorbió con el homogenado testicular en virtud de la reactividad demostrada en la primera testificación. Su resultado fue negativo. El suero antiproteínas séricas de cobayo reveló 4 líneas de precipitación frente a los homogenados de testículo, de hígado y a las globulinas; 3 líneas frente al homogenado de riñón y 2 frente a la fracción 1 y a la albúmina. (**Fotos nº 4 y 5**).

Una sola línea de precipitación fue revelada frente al mucopolisacárido testicular, a la hialuronidasa y a la glucoproteína sérica, mientras que el resto de los antígenos utilizados dieron resultados negativos.

Inyección intratesticular de suero heterólogo antihomogenado: las lesiones observadas fueron agrupadas en 3 tipos distintos.

**Grado I**: con congestión vascular, exudación de polinucleares al espacio intertubular, vacuolización de las células de Sertoli y descamación o desprendimiento hacia la luz tubular de las células germinales adyacentes;

**Grado II**: disminución de la congestión y exudación vascular; aumento de la descamación celular en la luz, de la vacuolización Sertoliana y casos aislados de citólisis de las células germinales en escasos túbulos. Estos fenómenos se acompañan de una leve infiltración de mononucleares en los espacios intertubulares, en el epidídimo y en el intersticio de la rete testis;

**Grado III**: predominan los infiltrados mononucleares en áreas extensas comprometiendo a los túbulos seminíferos y a la rete testis. La descamación de las células germinales puede ser total.

Los resultados obtenidos mediante la inyección del suero *heterólogo* se resumen así:

48 horas: Grado I.

96 horas: Grado I.

7 días: Grado I.

15 días: Grado II.

25 días: no existen fenómenos inflamatorios; regeneración parcial; descamación mínima.

37 días: aspecto normal.

Los resultados obtenidos por medio de la inyección del suero *homólogo* se resumen así:

48 y 96 horas: Grado I.

7 y 15 días: Grado II.

25 días: Grado III.

37 días: comienza la reparación tisular sin fenómenos inflamatorios con escasos mononucleares. (**Fotos nº 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.**)

Los resultados obtenidos por la inyección de suero *normal* de cobayo se resumen así:

48 y 96 horas: Grado I.

7 días: reparación tisular sin descamación ni daño tubular.

15, 25 y 37 días: aspecto normal.

Los resultados obtenidos por medio de la inyección intratesticular de suero normal de conejo, pueden resumirse de la siguiente manera:

- 48 horas: Grado I: similar al anterior, con discreta vacuolización de las células de Sertoli. Algún foco aislado de descamación.
- 96 horas: Grado I: la imagen histológica es casi la misma, pero con atenuación de los fenómenos inflamatorios.

- 7 días: imagen histológica casi normal. No hay daño tubular ni descamación germinal o infiltrados mononucleares.
- 15 días: aspecto normal.
- 25 días: aspecto normal.
- 37 días: aspecto normal.

Los resultados obtenidos con la inyección de solución fisiológica en forma intratesticular, en un grupo de control, pueden ser resumidos de la siguiente manera:

- 48 horas: Grado I: se mantienen los mismos fenómenos inflamatorios de poca monta.
- 96 horas: Grado I: similar al anterior; disminuyen los fenómenos inflamatorios.
- 15 días: aspecto normal del testículo.
- 25 días: aspecto normal.

Los resultados conseguidos con la punción simple del testículo, también en otro grupo de control, pueden resumirse de la siguiente manera:

48 horas: similar al anterior, pero con algún foco hemorrágico pequeño, con exudación leucocitaria a predominio polimorfonuclear.

96 horas: similar al anterior, cercano al foco hemorrágico, se aprecia vacuolización de las células de Sertoli.

15 días: aspecto histológico normal.

25 días: se observa en un animal un foco hemorrágico. El otro, normal.

Se transcriben los resultados histopatológicos obtenidos mediante la inyección intratesticular de células de ganglio de animal normal y de animal sensibilizado con homogenado testicular. No se han establecido grados de lesión histológica, ya que en los primeros estadios, la inyección de células podía inducir a errores interpretativos. Por ende, se siguió la pauta de la descripción de cada estadio estudiado.

a) Inyección de células de ganglio de cobayo normal:

48 horas: ligera congestión y edema; infiltrados leucocitarios y mononucleares escasos; no hay daño tubular.

96 horas: similar al anterior, con disminución de la presencia de células inflamatorias en el espacio intertubular.

10 días: aspecto casi normal con pequeños y aislados focos de edema seroalbuminoso.

20 días: similar al anterior.

30 días: aspecto normal.

Los resultados obtenidos mediante la inyección intratesticular de células de ganglio de animal sensibilizado con homogenado testicular, pueden resumirse de la siguiente manera:

- 48 horas: zonas con edema seroso de menor intensidad que en los tiempos anteriores; aparecen pequeños infiltrados mononucleares e histiocitarios alrededor de algunos túmulos, que se conservan indemnes. Ligera vacuolización de las células de Sertoli sin descamación del epitelio germinal.
- 96 horas: muy parecido al anterior, pero con desaparición casi completa.
- 10 días: no se aprecia edema seroalbuminoso ostensible. Infiltrados en regueros peritubulares más marcados; vacuolización de las células de Sertoli, en especial, en algunos túmulos que manifiestan un daño apreciable. Descamación del epitelio.
- 20 días: similar al anterior aunque se notan 2 fenómenos: 1) aumento de la alteración tubular con descamación marcada del epitelio germinal, y 2) disminución de los infiltrados mononucleares peritubulares.
- 30 días: imagen no tan intensa como la anterior, dando la impresión de estar en marcha un proceso de reparación sin acompañarse de fenómenos inflamatorios. Infiltrados celulares en focos aislados. **(Foto n° 16 a 22).**

Los estudios histopatológicos de los testículos de cobayos que recibieron tacrolimus y, simultáneamente, fueron experimentalmente agredidos con homogenado testicular, con antisuero heterólogo y homólogo, con células linfocitarias provenientes de ganglio normal y de ganglio de animal inmunizado con homogenado testicular, demostraron en los mismos tiempos que no se producían lesiones titulares de importancia.

Sólo se observó ligera congestión y edema sin infiltrados leucocitarios ni mononucleares. No hubo daño tubular; las células de Sertoli no evidenciaban ninguna alteración morfológica. (Fotos n° 23, 24 y 25 ).

### **Discusión**

Los resultados presentados ponen de manifiesto que un potente inmunosuero antihomogenado testicular de cobayo, puede ser inducido más fácilmente en conejos que en cobayos.

Sin embargo, la reactividad serológica del antisuero heterólogo es cualitativamente similar a la del homólogo, como se desprende de los datos logrados por la fijación del complemento. Por otra parte, este resultado está de acuerdo con el tipo de reacción de hipersensibilidad retardada provocada por la inmunización autóloga y homóloga en el cobayo con antígenos testiculares.

Es sabido también que a pesar de su bajo título, el antisuero homólogo, reacciona por fijación del complemento, P.C.A. y doble difusión en agar, con su propio antígeno o con espermatozoides epididimarios, ocurriendo lo mismo con el suero humano homólogo antihomogenado testicular.

Los interrogantes se inician cuando el suero homólogo antihomogenado testicular, resulta positivo por fijación del complemento, no sólo frente a las complejas fracciones 1 y 2, células germinales y espermatozoides, sino también, frente a los homogenados de hígado y riñón homólogos.

Quizás la poca sensibilidad del método de Ouchterlony explique el hecho de que este antisuero reproduzca sólo 2 bandas de precipitación con su propio antígeno, el homogenado y la fracción 1, y ninguna banda contra el resto de los antígenos.

Además de esta técnica, al emplear el antisuero heterólogo, no sólo confirma sino que amplifica los resultados logrados con el inmunosuero homólogo.

A su vez, Tamura (1985) ha demostrado que la toxina de la BP (*Bordetella pertussis*) incrementa las respuestas de hipersensibilidad retardada, inhibiendo la inducción de células supresoras de la DTH.

Otra anomalía frecuentemente observada fue la vacuolización y rarefacción del citoplasma de la célula de Sertoli, hecho que también fue visto en los testículos lesionados de las ratas inmunizadas con HT, lo cual nos hace pensar que la alteración, primaria o secundaria, de la célula de Sertoli podría ser un mecanismo común en el daño de la espermatogénesis en la OAE.

Adenkule (1987), siguiendo métodos similares a los usados para la purificación de autoantígenos del testículo de cobayo, fallaron en la obtención de un antígeno aspermatogénico relevante a partir del testículo de ratón. Sugirió que estos antígenos estarían en el testículo murino, comparado con el de cobayo, en un número mucho menor y además en forma altamente insoluble.

Aproximadamente 20 días después de la inmunización, la lesión testicular se hizo evidente en la mayor parte de los animales pertenecientes al grupo experimental de OAE. El hallazgo más significativo, en este período, es la estrecha asociación entre la aparición del daño tisular y la disminución de células CD8+, con ascenso de la relación CD4/CD8, en los ganglios linfáticos de los animales lesionados, cuando se compara estos datos con los obtenidos en animales de los respectivos grupos de controles.

Los resultados descriptos y discutidos en este trabajo permiten una mejor comprensión de los mecanismos inmunopatogenéticos que gobiernan el desarrollo de la orquitis autoinmune experimental. Considerando que, existen patologías testiculares asociadas a esterilidad masculina que muestran un cuadro semejante a la OAE, las conclusiones aquí presentadas pueden ser de alguna utilidad en el esclarecimiento de ciertos mecanismos de alteración de la fertilidad en el hombre. Particularmente, en aquellos individuos en los cuales diferentes enfermedades del tracto genital, tales como infecciones, traumatismos y malformaciones

congénitas, permiten o favorecen la llegada de autoantígenos testiculares o espermáticos a los ganglios linfáticos, en donde, de acuerdo a las interacciones celulares de las distintas subpoblaciones, se generarán linfocitos autorreactivos que desencadenarán un daño autoinmune.

La real existencia de células supresoras y reguladoras, como entidades de función, son motivo actual de controversia; sin embargo existen múltiples evidencias de células que, en determinadas circunstancias, ejercen acciones inhibitorias sobre distintos tipos de respuesta inmune, y más aún, sobre el desarrollo de la patología en casi todos los modelos experimentales de enfermedades autoinmunes.

Algunos autores (Linthium, 1982) postulan que BP podría incrementar la permeabilidad de las barreras hemato-tisulares permitiendo así el fácil acceso de linfocitos T activados al órgano blanco.

Acorde con este punto, se ha dicho que los antígenos específicos de tejido, como ocurre con la tiroglobulina, poseen más determinantes antigénicos activos en su reacción con heteroanticuerpos que con autoanticuerpos.

Este podría ser el caso de los acrosomas total, insoluble y soluble, el mucopolisacárido testicular, la hialuronidasa y la glucoproteína testicular, que son fácilmente reconocibles por el suero heterólogo antitestículo en las técnicas de precipitación.

Otros antígenos como el mucopolisacárido y la glucoproteína conectivos y la glucoproteína sérica, fueron negativos contra ambos antisueros en ambas técnicas serológicas, a pesar de su origen glucoprotídico tan cercano al de los mencionados más arriba.

La presencia de proteínas séricas exclusivamente en el homogenado testicular y la fracción 1, fue verificada por fijación del complemento y por Ouchterlony, empleando un suero antiproteínas séricas de cobayo.

Los resultados negativos obtenidos con el mucopolisacárido testicular, la hialuronidasa y la glucoproteína sérica mediante la fijación del complemento, se positivizaron al practicar la prueba de Ouchterlony, por la cual, sin embargo, el acrosoma y la glucoproteína testicular siguieron siendo negativos.

La falta de resultados positivos por fijación del complemento en las reacciones directas realizadas con suero antitestículo y albúmina y globulinas como antígenos, se contrapone a la presencia de bandas de precipitación obtenidas con los mismos elementos en la prueba de Ouchterlony.

Estos resultados, que se observan solamente con el antisuero heterólogo dan fuerza a la idea del bajo contenido en anticuerpos del antisuero homólogo, y la predominancia de la naturaleza de las precipitinas, como ejemplo de anticuerpos antiproteínas séricas.

No obstante, la posibilidad de una antigenicidad mayor de las proteínas séricas de inmunización heteróloga parece más razonable que en la inmunización homóloga.

Es interesante señalar, que el antisuero homólogo al revés de lo que se halló con el heterólogo, no reaccionó con la fracción 2, tanto por fijación del complemento como por Ouchterlony, lo que está de acuerdo con observaciones precedentes que demostraron que las fracciones 1 y 2, así como, el mucopolisacárido testicular resultaban positivos por el test de anafilaxia cutánea pasiva (P.C.A.), pero constantemente negativos por inmunoelectroforesis.

Admitiendo apriorísticamente que la evaluación de las reacciones de identidad en los tests de inmunodifusión resulta dificultosa, los resultados obtenidos y expuestos, demuestran que, el homogenado testicular tiene antigenicidad común con otros antígenos inherentes al testículo, como ser, las fracciones 1 y 2, las células germinales, los espermatozoides y el acrosoma, basándose en el número y en la correlación de las bandas de precipitación, independientemente de las de otros tejidos o proteínas séricas.

Cierta identidad fue también verificada entre los espermatozoides y la glucoproteína testicular, siendo la misma menos evidente con la hialuronidasa.

La relación antigénica de las líneas de las células germinales, los espermatozoides y el acrosoma fue menos notoria con aquellas de las fracciones 1 y 2, y prácticamente ausente al compararlas con las de los homogenados de hígado, de riñón, la albúmina y las globulinas.

Estos resultados fueron corroborados por la similitud en los patrones de líneas de precipitación del homogenado testicular y la fracción 1, y aquellos de la albúmina y de las globulinas, cuando los 4 reaccionaron con el suero de conejo antiproteínas séricas de cobayo. La especificidad de los resultados obtenidos con ambos antisueros antitestículo, verificada con las absorciones correspondientes por fijación del complemento y por Ouchterlony, demostró una cierta remoción selectiva de bandas previamente obtenidas con los antígenos, y la persistencia de otras atribuibles a los componentes testiculares que quedaban.

Con todo, las limitaciones naturales de las técnicas de absorción, especialmente cuando se emplea un antisuero complejo, no permiten sacar conclusiones definitivas.

De todos modos, los resultados expuestos, tienden a indicar que el antisuero antitestículo aparece contaminado con otros anticuerpos contra proteínas tisulares, y también, contra proteínas séricas.

De las 7 bandas obtenidas frente al homogenado testicular, 2 ó 3 parecen ser específicas para el tejido testicular, 2 ó 3 revelan identidad de hígado y riñón, y las 3 restantes con las proteínas séricas.

Estos resultados son coincidentes con los de otros autores, que emplearon un extracto testicular de ratón y de cobayo, frente a un suero de conejo antitestículo, testificando por Ouchterlony e inmunoelectroforesis.

Por el contrario, la reactividad serológica de las células germinales, los espermatozoides y el acrosoma, que revelan 1 ó 2 bandas, antigenicidad común, y ningún otro contaminante, dan fundamento al criterio de que ellos constituyen el sitio celular de los antígenos testiculares más específicos.

También ha sido demostrado que sólo el acrosoma de las espermátidas y de los espermatozoides reaccionan por inmunofluorescencia con el antisuero antitestículo.

Sin embargo, la posibilidad de que más de un antígeno de naturaleza glucoproteica esté presente en el espermatozoide en el acrosoma o en otras estructuras de ésta célula, parecen circunstancias por la presencia de sólo una banda de precipitación verificada con el acrosoma, el mucopolisacárido testicular, la hialuronidasa y la glucoproteína testicular. Otros antígenos, tales como el mucopolisacárido conectivo y la glucoproteína conectiva, no parecen relacionados con la antigenicidad del homogenado testicular, sus fracciones proteicas derivadas o los espermatozoides.

La heterogeneidad de los antisueros antitestículo homólogo y heterólogo, deberá ser tenida en cuenta cuando – como se describirá más adelante – las propiedades de estos sueros son correlacionadas con su efecto deletéreo sobre las células germinales, tanto “in vivo” como “in vitro”.

Los resultados obtenidos mediante la inyección intratesticular de los sueros homólogo y heterólogo, ponen de manifiesto que un daño de la gonada puede ser inducido por esta vía.

Sin embargo, es preciso realizar una consideración más precisa, dado que, cronológicamente, las modificaciones titulares apreciadas presentan matices diferentes.

Estos cambios testiculares deben analizarse también en comparación con aquellos obtenidos con la inyección de sueros normales controles, de solución fisiológica, y del simple traumatismo producido por la punción de la aguja.

En términos generales, puede decirse que los fenómenos vasculares predominaron durante la primera semana, mientras que, las lesiones focales con lisis de las células germinales e infiltrados mononucleares, que remedaban aquellos descritos en la orquitis alérgica clásica, aparecieron entre la tercera y la séptima semanas. Es interesante destacar que el número de focos y la extensión de las lesiones aumentaron durante las últimas semanas.

Las lesiones de tipo vascular, con congestión y exudación serosa y focos de polimorfonucleares peritubulares, pero sin lesión tubular ni alteraciones Sertolianas, pueden aparecer como respuestas inespecíficas, detectadas con los 4 sueros empleados, independiente del tenor de anticuerpos antitestículo circulantes, puesto de manifiesto, por otra parte, por las técnicas serológicas descritas anteriormente.

Sin embargo, es valedero destacar que aunque los sueros heterólogo y homólogo producen las mayores alteraciones, las debidas al último antisuero, podrían aparecer con ligera



antelación a las ocasionadas por el primer antisuero.

Así, al 7° día mientras que con el suero heterólogo se consiguieron lesiones de Grado I, en la mayoría de los testículos inyectados con el suero homólogo, las lesiones eran de grado II incipiente.

Los sueros normales, por su parte, arrojaron un panorama distinto. A los 7 días, si bien persistían algunos fenómenos vasculares, también se objetivaban fenómenos reparativos, con lo cual, con estos sueros controles, sólo se llegó al Grado I de lesión histológica.

Con solución fisiológica, y con la simple punción del testículo, las lesiones fueron mínimas, y en casos escasos pueden incluirse en el Grupo I; no obstante, la reparación tisular fue rápida y a los 7 días, pocos focos hemorrágicos podían observarse, mientras los procesos de reconstrucción eran muy activos.

En la consideración evolutiva de las lesiones histológicas, se advierte que mientras con el suero heterólogo, sólo se llegan a producir cambios de Grado II, con el homólogo se obtienen modificaciones descritas como Grado III.

En el día 25, los testículos inyectados con suero heterólogo, muestran zonas de reconstrucción tisular, mientras que los inyectados con suero homólogo evidencian graves lesiones de Grado III.

En el 37° día, los primeros, se encuentran prácticamente reconstruidos, mientras que los segundos, se hallan en plena lesión de Grado III, aunque algunos evidencian signos leves de reparación.

Recientemente, una actividad citofílica fue hallada en el suero de cobayos sensibilizados en forma homóloga, con homogenado de testículo más adyuvante completo de Freund.

Esta propiedad no es complemento – dependiente.

La especificidad de esta experiencia fue demostrada por los autores, empleando como células controles, hematíes y leucocitos de los mismos animales de experimentación, el suero con propiedades citofílicas, y los espermatozoides autólogos u homólogos.

Ambas células controles, no adsorbían en su superficie a los espermatozoides.

La fracción IgG<sub>2</sub> parece ser la responsable de esta propiedad citofílica; su significación fisiológica, posiblemente esté relacionada con el mecanismo de fagocitosis.

Los mismos macrófagos aislados del peritoneo de cobayo, dentro de los 7 días de la sensibilización con homogenado testicular, exhiben una inhibición de la migración in vitro, al ponerse en contacto con el sobrenadante del homogenado testicular.

Al parecer, esta prueba de laboratorio puede preceder en su positividad a la prueba cutánea clásica.

También esta técnica de inhibición de la migración de los macrófagos, puede permitir una cuantificación de los resultados, con más fidelidad que la prueba cutánea.

Dejando de lado factores específicos responsables por el daño tisular, resulta prematuro asegurar si los anticuerpos fijadores del complemento o precipitantes, son los únicos anticuerpos humorales involucrados en el proceso.

Estudios empleando diferentes fracciones inmunoglobulínicas separadas de sueros normales o de sueros inmunes, podrían clarificar su participación en la patogénesis de las lesiones de los túbulos seminíferos.

El papel que jugaría la transferencia pasiva de complejos antígeno-anticuerpo transportados por el suero inmune o la posibilidad de que estos complejos pudieran ser inducidos después de la inyección intratesticular del suero inmune, no está debidamente aclarada.

Mientras otros autores evaluaron los testículos sólo durante la primera semana, aquí nos hemos extendido hasta la séptima semana, donde las lesiones son evidentes, en particular con el suero homólogo.

Por otra parte, se ha empleado aquí la vía intratesticular para la inyección del antisuero, lo cual favorece su difusión en los espacios intertubulares, mientras aquellos autores utilizaron el espacio subalbugíneo, donde la absorción del antisuero por los vasos linfáticos podría ocurrir e impedir su adecuada distribución en los espacios intertubulares.

Si bien se deduciría que las lesiones podrían ser causadas por una acción directa del

antisuero, el mecanismo de lisis de las células germinales permanece todavía en el terreno especulativo.

Si aceptamos que un mecanismo inflamatorio puede aumentar la permeabilidad de la barrera que rodea la rete-testis y los tubos seminíferos, entonces los fenómenos vasculares iniciales y de la primera semana, podrían explicar la facilidad de acceso, tanto del suero normal como de los inmunosueros. Acto seguido, los anticuerpos inducirían la vacuolización de las células de Sertoli y la descamación de las células germinales.

La interacción del antígeno y de los anticuerpos, así como de los antígenos liberados de las células germinales, pueden provocar una acumulación local de células mononucleares.

Esta interpretación está de acuerdo con el concepto de la necesidad de una coparticipación de fenómenos inmunológicos de tipo humoral y de tipo celular para inducir una orquitis alérgica; concepto que sustentan aún aquellos que consideran que la secuencia de lesiones se inicia en la rete-testis y se disemina en los espacios intertubulares.

Los resultados obtenidos con la inyección de células inmunológicamente competentes, provinieran éstas de ganglio de animal normal o de animal sensibilizado con homogenado testicular, merece una discusión aparte.

En primer término, se debe destacar que durante los primeros 10 días prácticamente las imágenes histológicas son similares para ambos experimentos, con muy ligera predominancia en riqueza celular, de aquellos pertenecientes a la inyección de células provenientes de ganglio de animal sensibilizado. No resulta prudente atribuir a estas imágenes connotación alguna, ya que las células inyectadas, en su mayoría histiocitos y linfocitos, no pueden ser diferenciados –por las técnicas aplicadas aquí– de aquellos propios del huésped.

Por ende, podría decirse que la respuesta es inespecífica, por los menos hasta las imágenes del 10º día, donde la diferencia se hace más notoria, y se puede poner en duda la no especificidad de la reacción, en virtud de que ha pasado un tiempo razonable como para que se hubiera efectuado una movilización celular hacia el sitio de la inyección, y una modificación parcial o total de las células inyectadas. A partir del 10º día, las agresiones del tejido receptor son más evidentes. La vacuolización de las células de Sertoli se hace más evidente, y la descamación del epitelio germinal comienza a visualizarse. La diferencia con el control es ahora notoria y no deja lugar a dudas.

Esta progresión de lesión histológica va en aumento hasta alcanzar su acmé en el 20º día, con alteración tubular marcada y con infiltrados mononucleares peritubulares presentes, aunque en ligera disminución con relación a los días precedentes. Estas lesiones se van atenuando y alrededor del día 30º se comienzan a apreciar fenómenos de reparación tubular, aunque persistan los infiltrados mononucleares.

La producción de lesión histológica mediante la inyección de células inmunocompetentes no es de fácil explicación, no obstante haber sido la transmisión pasiva de la inmunidad celular por glóbulos blancos una posibilidad demostrada. Las células de ganglio sensibilizado pueden ser portadoras de antígenos testiculares vehiculizados por vía linfática al practicar la inyección sensibilizante. Estos antígenos podrían estar adosados a la membrana celular en receptores especiales o bien incorporados ya en el citoplasma celular. También las células mononucleares inyectadas podrían ser portadoras de anticuerpos homólogos antitestículo en proceso de síntesis, y que podrían ser liberados en el huésped al producirse la reacción inflamatoria de la primera semana.

Luego se acentuaría la liberación de más antígenos testiculares (del receptor) los que intensificarían el mecanismo de síntesis de anticuerpos específicos. La coparticipación de ambos mecanismos, formando o no complejos inmunes con el complemento del huésped, podrían ser los pasos iniciales que inducirían las modificaciones citológicas descritas (vacuolización de las células de Sertoli y descamación del epitelio germinal) y los infiltrados mononucleares presentes que conformarían la imagen histológica compatible con la orquitis autoinmune. No se deben olvidar tampoco los llamados “factores solubles” de la inmunidad celular (citoquinas, quimioquinas) por parte de las células mononucleadas, íntegras y activadas o en lisis, que facilitarían la concurrencia de otras células mononucleares para

formar el infiltrado típico.

El empleo del adyuvante completo de Freund es imprescindible para el desarrollo de las lesiones de orquitis, pues la inmunización con tejido testicular solo o con adyuvante incompleto únicamente produce anticuerpos circulantes evidenciados por el PCA test y la inmunofluorescencia, y, en escasos casos, lesión tisular.

Las lesiones testiculares se correlacionan con una prueba cutánea positiva de lectura tardía realizada con homogenado testicular, en la piel de los animales sensibilizados con dicho antígeno. Más recientemente, una preparación de ARN extraído de ganglios linfáticos o del bazo de cobayos sensibilizados con homogenado testicular más adyuvante de Freund, resultó útil para transferir pasivamente la orquitis inmunológica, a animales homólogos normales.

La lesión de la orquitis alérgica puede ser encuadrada en el grupo IV de la clasificación de Gell y Coombs, sin dejar por ello de considerar los mecanismos de tipo II y III con posibles copartícipes en determinadas ocasiones. Por último, otro hecho que no debe dejar de consignarse, es el de que esta reacción pudiera tratarse de un rechazo de injerto, por ser animales de cepas distintas. Este argumento queda invalidado por el grupo de control que no muestra lesiones más allá de la primera semana, época en que justamente comienzan a aparecer los signos típicos del rechazo. Otro elemento positivo que aboga a favor de la importancia de la inmunidad celular en la génesis de la orquitis autoalérgica, es el que se desprende del hecho de la prevención o imposibilidad de inducir la aspermatogénesis en animales timectomizados al nacer, al igual que la administración de drogas inmunodepresoras antes de la sensibilización.

Los cobayos que recibieron **tacrolimus** no evidenciaron grandes cambios en los niveles de anticuerpos específicos, pero sí modificó la intensidad de los infiltrados celulares que se habían manifestado en los otros grupos experimentales tanto con la inoculación de anticuerpos heterólogo, homólogo y antiproteínas séricas, como con células linfocíticas provenientes de ganglios de animales normales e inmunizados con homogenado testicular. De esta manera, se admite que la actividad depresora de las poblaciones LT efectoras es posible ante el efecto farmacológico del **tacrolimus** frenando así la producción de citoquinas proinflamatorias, y, a la postre, de lesiones irreversibles en el órgano de choque. Similares efectos son bien conocidos en los transplantados tratados con **tacrolimus**. Esta acción inmunomoduladora podría resultar de cierta utilidad en minimizar el desarrollo de la OAE y de aquellos procesos inflamatorios, traumáticos e inespecíficos de las gonadas masculinas.-

#### **Bibliografía.**

- 1.- Landsteiner K : Zur Kenntnis der spezifisch auf blutkörperchen wirkenden sera. Zentralbl Bakteriol Parasitenk, 1899; 25 : 546.
- 2.- Metchnikoff E. : Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines, sur le spermatoxine et l'antispermatoxine. Ann.Inst.Pasteur (Paris), 1900 ; 14 : 1.
- 3.- Voisin G., Delaunay A., Barber M. : Sur des lésions testiculaires provoquées chez le cobaye par iso-et auto-sensibilisation. Ann.Inst.Pasteur, (Paris), 1951 ; 81 : 48.
- 4.- Freund J., Lipton M., Thompson G. : Aspermatogenesis in the guinea pig induced by testicular tissue and adjuvant. J. Exp. Med., 1953; 97 : 711.
- 5.- Freund J., Thompson G., Lipton M. : Aspermatogenesis, anaphylaxis and cutaneous sensitization induced in guinea pigs by homologous testicular extracts. J.Exp.Med., 1955; 101 : 591.
- 6.- Fritz T., Lombard L., Tyler S., Norris W. : Pathology and familial incidence of orchitis and its relation to thyroiditis in a closed beagle colony. Exp.Mol.Pathol., 1976 ; 24 : 142.
- 7.- Dooher G., Artz K., Bennett D., Hurtenbach V. : Spontaneous allergic orchitis in sterile mice carrying a recessive, lethal mutation at the T/t complex. J.Reprod.Fertil., 1981; 62 : 505.
- 8.- Tung K., Ellis L., Childs G., Dufau M. : The dark mink : a model of male infertility. Endocrinology, 1984 ; 114 : 922.
- 9.- El-Demiry M., Hargreave T., Bussuttil A., James K. : Lymphocyte subpopulations in the

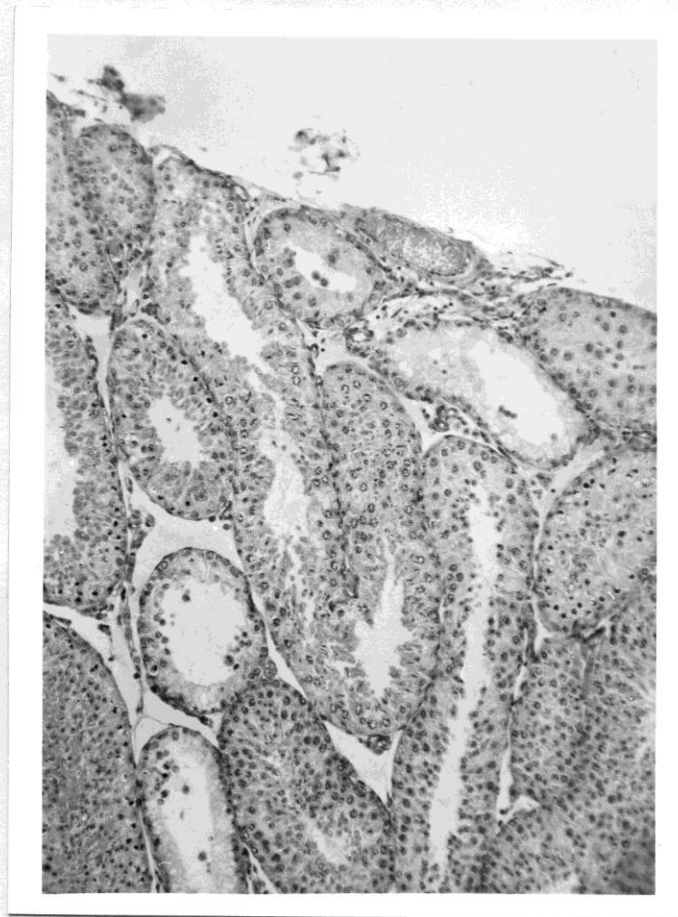
- male genital tract. *Br.J.Urol.*, 1985 ; 57 : 769.
- 10.- El-Demiry M., Hargreave T., Bussuttil A. : Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil & Steril.*, 1987 ; 48 : 470.
- 11.- Suoninen J., Soderstrom K. : Lymphocyte infiltration in human testicular biopsies. *Int. J. Androl.*, 1982 ; 5 : 461.
- 12.- Mancini R.E., Alonso A., Saraceni A., Bachmann A., Lavieri J., Nemirovsky M. : Immunological and testicular response in man sensitized with human testicular homogenate. *J.Clin.Endocrin.*, 1965 ; 25 : 859.
- 13.-Rogers C., Klatt E. : Pathology of the testis in acquired immunodeficiency syndrome. *Histopathology*, 1988 ; 12 : 659.
- 14.- Salomon F., Hedinger C. : Abnormal basement membrane structure of seminiferous tubules in infertile men. *Lab. Invest.*, 1982 ; 47 : 543.
- 15.- Tung K. In "Male contraception. Advances and future prospects." (Eds. Zatuchi & Sciarra), p.382, Philadelphia, 1985.
- 16.- Yung K. Autoimmunity of the testis. In: "Immunological aspects of infertility and fertility regulation". (Eds Dhindsa & Schumacher), p. 33, Elsevier, New York, 1980.
- 17.- Tung K., Menge A. Sperm and testicular autoimmunity. In: "Autoimmune diseases". (Eds. Rose & Mackay). P. 537, New York, Academic Press, 1985.
- 18.- Brown P., Glynn L. : The early lesion of experimental allergic orchitis in guinea pigs. *J.Path.*, 1969; 98 : 277.
- 19.- Mazzolli A. : Demonstration in vitro of delayed hypersensitivity in experimental allergic orchitis in guinea pigs. *J.Reprod.Fertil.*, 1971; 26 : 161.
- 20.- Meng A., Tung K. : Cell-mediated and humoral immune responses to aspermatogenic antigen in experimental allergic orchitis in guinea pigs. *J.Reprod.Fertil.*, 1983 ; 69 : 279.
- 21.- Tung K. , Meng A. : Autoimmunity to spermatozoa and the testis. *Immunological Review*, 1981; 55 : 217.
- 22.- Alonso A., Scacciati J., Bueno M.,Mancini R.E. : Immunological response of guinea pigs sensitized with homologous antigens. *Am.J.Reprod.Immunol.*, 1984; 6: 14. :
- 23.- Hiramane C., Hojo K. : Requirement of B lymphocytes in local adoptive transfer of experimental allergic orchitis by lymph node cells. *Am.J.Reprod Immunol.*, 1984 ; 6 : 85.
- 24.- Willson J., Jones N. : Induction of aspermatogenesis by passive transfer of immune sera or cells. *Int.Arch. Allergy appl Immunol.*, 1972; 43 : 172.
- 25.- Lustig L., Doncel G., Denduchis B. : Testis lesions and cellular and humoral immune response induced in rats by immunization with laminin. *Am. J. Reprod. Immunol & Microbiol.*, 1987; 14 : 123.
- 26.- Mancini R.E. : Immunologic factor in spermatogenesis. *Excerpta Medica International Congress*, series n° 184, 1968.
- 27.- Kennedy W. : The production of spermotoxins. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 1924 ; 14 : 279.
- 28.- Pokorna Z. : An isologous model of experimental autoimmune aspermatogenesis in mice. *Folia biol.*, (Praha), 1963; 9, 203..
- 29.-Katsch S. : Localization and identification of aspermatogenic factor in guinea pig testicles. *Int. Arch. Allergy*, 1960 ; 16 : 241.
- 30.- Baum J. : Autosensitization by sperm in guinea pigs. *J.Immunol.*, 1961; 4 : 95.
- 31.-Mancini R.E. : Localization of acrosomal antigenicity in guinea pig testis. *Proc.Soc.exp.Biol.*, (N.Y.) ,1962; 8 : 435.
- 32.- Jegasothy B., Ackerman C. : Tacrolimus (FK506) a new therapeutic agent for severe recalcitrant psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 1992; 128 : 781.
- 33.- Schreiber S. : The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol.Today*, 1992; 13 : 136.
- 34.- Lauerma A. : Use of the newer immunosuppressive agents in dermatology. *BioDrugs*, 1997; 2 : 96.
- 35.- Shiraga T., Matsuda H. : Metabolism of FK506 a potent immunosuppressive agent by cytochrome P450 enzymes in rat, dog and human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*,

1994 ; 47 : 727.

36.- Myers S. : Update on new immunomodulatory agents. Advances in Dermatology, 2000; 16 : 228.

37.- Kawashima M. : Tacrolimus concentrations in blood during topical treatment of atopic dermatitis. Lancet, 1996; 348 : 1240.

38.- Ruzicka T. : European Tacrolimus Multicenter Atopic Dermatitis Study Group. N.Engl.J. Med., 1997 ; 337 : 816.



**Fig.n<sup>o</sup>19** : Corte de testículo de cobayo 20 días después de ser inyectado con células de ganglio linfático de cobayo sensibilizado con homogenado testicular.

Se observan lesiones tubulares consistentes en descamación del epitelio germinal y vacuolización Sertoliana. Los infiltrados peritubulares prácticamente han desaparecido. Hay congestión vascular subalbugínea.  
Hematoxilina-eosina. X 100

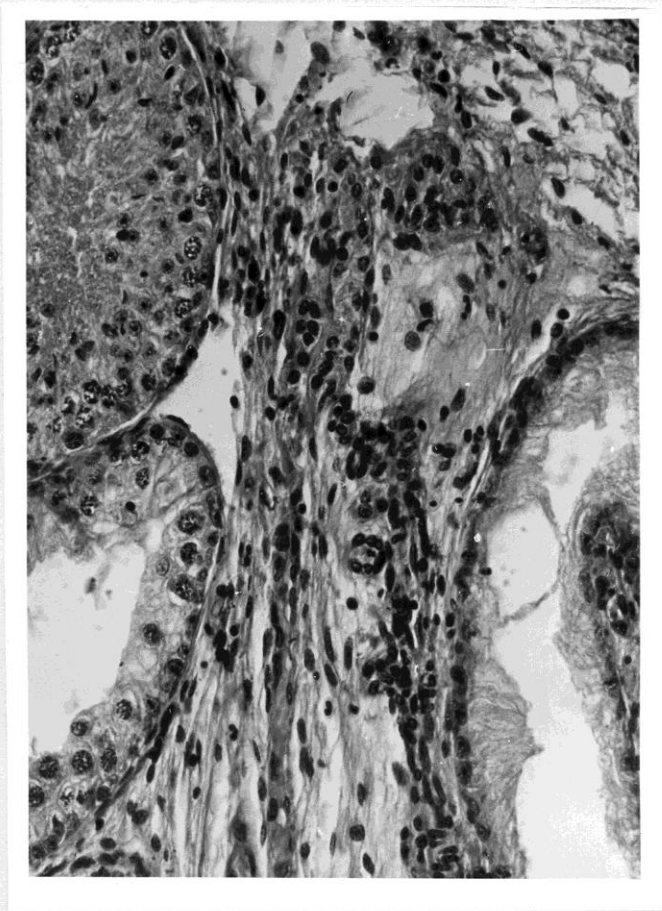


Fig.n° 18 : Corte de testículo de cobayo 10 días después de ser inyectado con células de ganglio linfático de cobayo sensibilizado con homogenado testicular.

Se verifican infiltrados peritubulares de tipo histolinfoplasmocitario acompañados de lesiones tubulares diversas, similares a las señaladas en la foto anterior.  
Hematoxilina-eosina. X-250



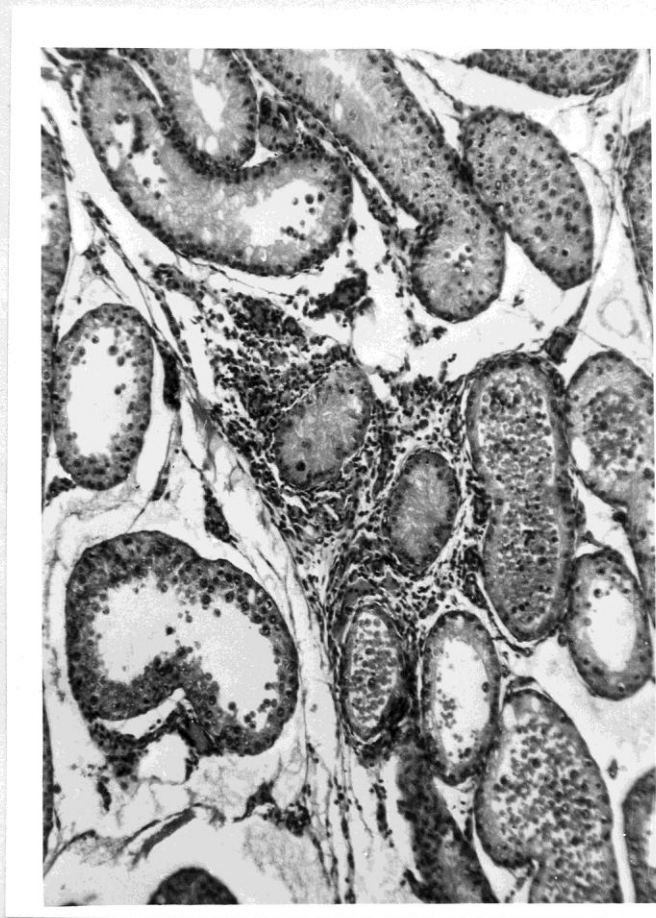
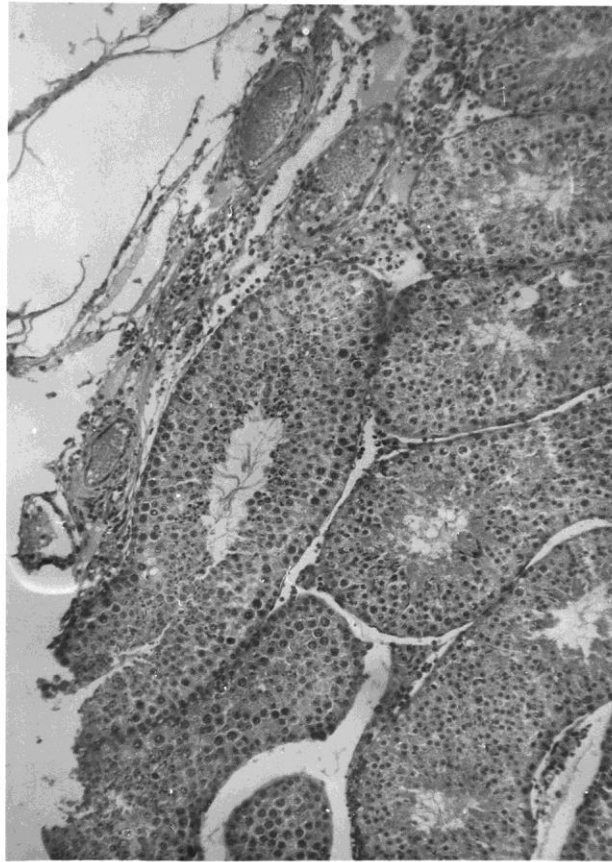


Fig.n° 17 : Corte de testículo de cobayo 6 días después de ser inyectado con células de ganglio linfático de cobayo sensibilizado con homogena do testicular.

Se aprecian infiltrados perivasculares y peritubulares de tipo histolinfoplasmocitario acompañados de lesiones tubulares consistentes en vacuolización de las células de Sertoli y ligera descamación del epitelio germinal. Hematoxilina-eosina. X100



**Fig. n° 16 :** Corte de testículo de cobayo 24 horas después de ser inyectado con células de ganglio linfático de cobayo sensibilizado con homogenado testicular.

Se observan regueros celulares perivasculares y peritubulares, presumiblemente del material inyectado, en la zona subalbugínea. La congestión vascular es manifiesta. Los túbulos conservan su indemnidad.

Hematoxilina-eosina. X 100



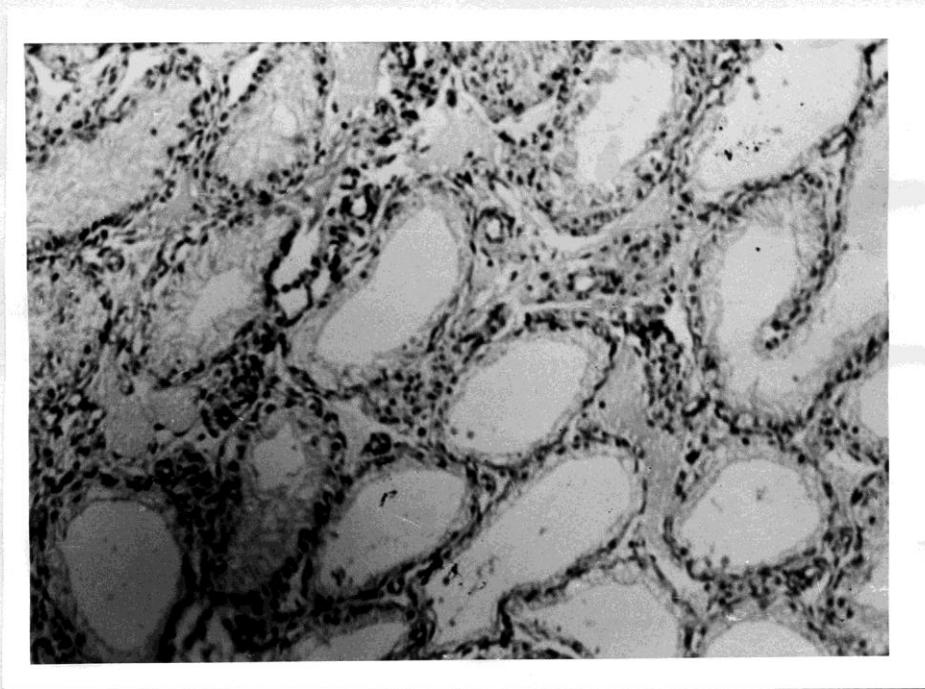


Foto n° 15 : Corte de testículo de cobayo, 4 semanas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis. Se observa la zona de daño tubular de la foto anterior, más magnificada. (Lesión Grado III)  
Hematoxilina-eosina. X 200.

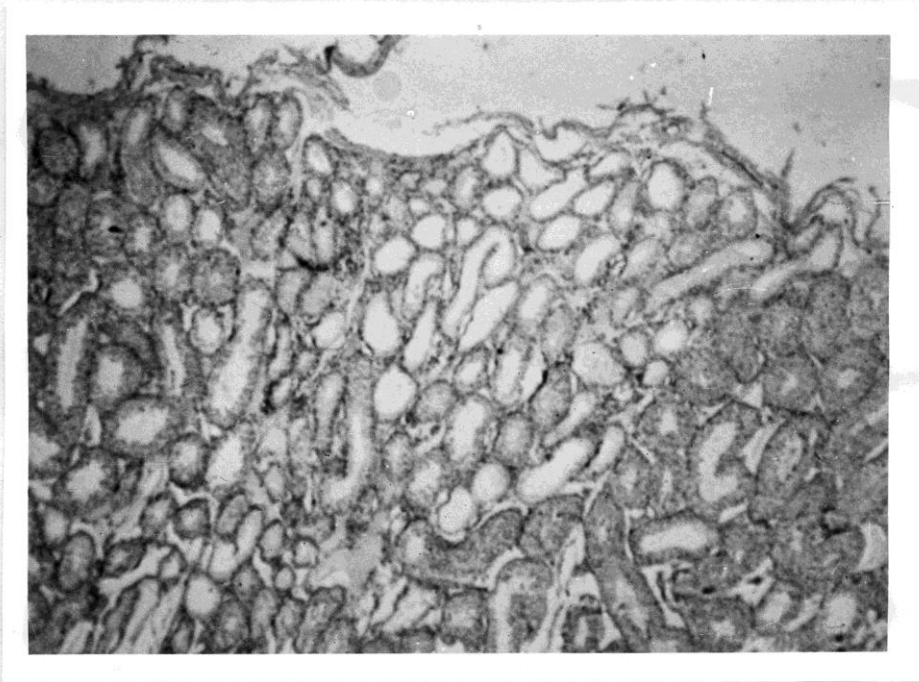


Foto n° 14 : Corte de testículo de cobayo, 4 semanas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis. Se observa un área de daño de los tubos seminíferos, por debajo de la albugínea. (Lesión Grado III). Hematoxilina-eosina. X 50.

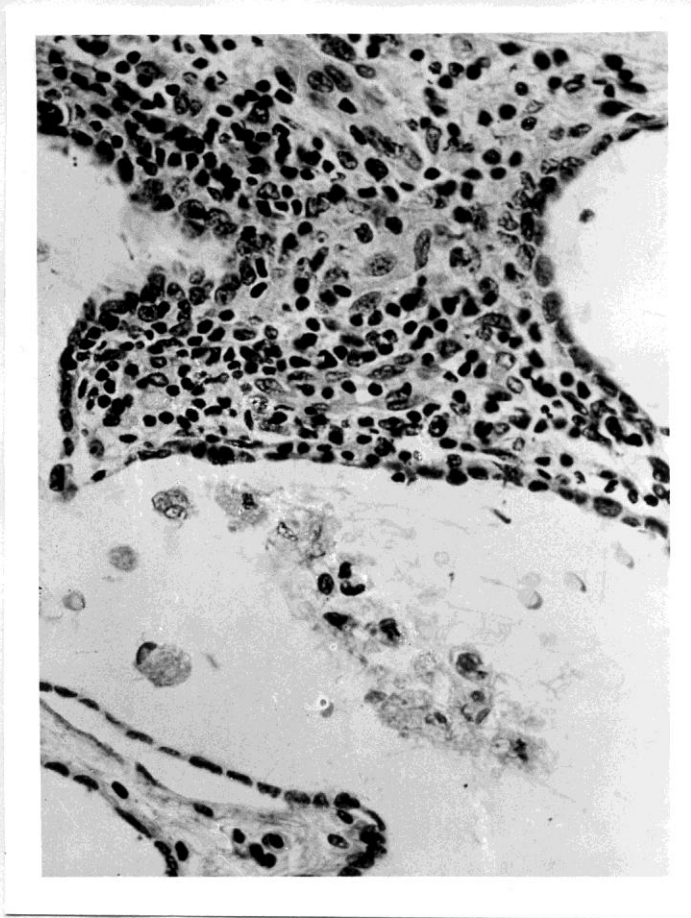


Foto n° 13 : Corte de testículo de cobayo, 4 semanas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis. La rete testis muestra una acumulación de células redondas mononucleadas. (Lesión Grado III). Hematoxilina-eosina. X 200



Foto n° 12 : Corte de testículo de cobayo, 4 semanas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis. La rete testis muestra una acumulación de células mononucleares. (Lesión Grado III) Hematoxilina-eosina. X 50.



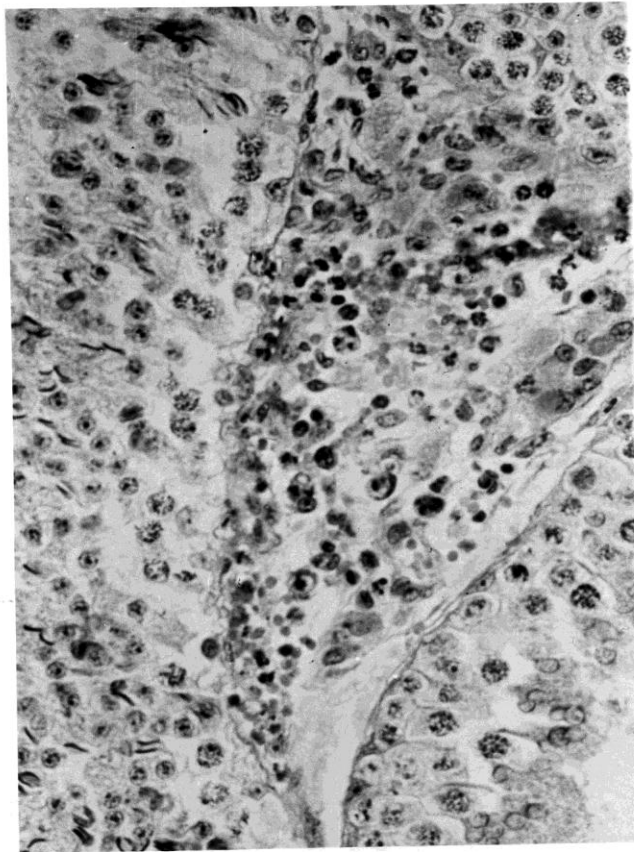


Foto n° 11 : Corte de testículo de cobayo, 24 horas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis.

Numerosos leucocitos aparecen distribuidos en el espacio intertubular, entremezclados con las células de Leydig. En el tubo seminífero de la izquierda, se observa la descamación de las células germinales. (Lesión Grado I).

Hematoxilina-eosina. X 200

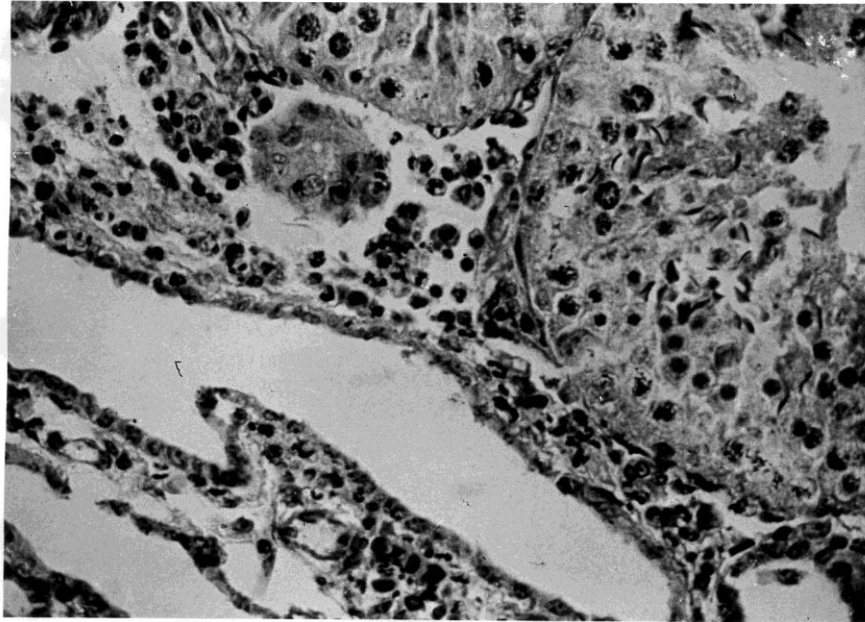


Foto nº 10 : Corte de testículo de cobayo, 24 horas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis. La rete testis muestra acumulación de leucocitos polimorfonucleares. (Lesión Grado I). Hematoxilina-eosina. X 200.



Foto n° 9 : Corte de testículo de cobayo, 24 horas después de la inyección intratesticular de suero homólogo antitestis. La rete testis muestra acumulación de leucocitos polimorfonucleares. (Lesión Grado I). Hematoxilina-eosina. X 50.

-----+++++\*\*\*\*\*+++++-----  
-----

## MICETISMOS. (PARTE 3): SÍNDROMES TEMPRANOS GASTROINTESTINALES

Alicia B. Pomilio, Stella M. Battista, Angel Alonso.

<sup>a</sup> Laboratorio de Química y Bioquímica Estructural, Departamento de Bioquímica Clínica, Hosp de Clínicas “José de San Martín”, Div. Alergia e Inmunología. Microbiología Cát II. UBA, SCA. ANCSA.

**Título en inglés:** Mushroom poisonings. Part 3: early-onset gastrointestinal syndromes

### Resumen

En esta Parte 3 de la serie de cuatro artículos sobre micetismos se analizan los síndromes tempranos con síntomas gastrointestinales que se caracterizan por presentar un período de latencia muy corto de menos de 6 horas después de la ingestión de los macromicetos. Los restantes síndromes tempranos con sintomatología compleja serán tratados en la Parte 4 de la serie. Actualmente se conocen más de 200 especies responsables de síndromes gastrointestinales, pero en este trabajo se abordarán solamente diez ejemplos que involucran los géneros *Boletus* [*Boletus satanas* (o *Rubroboletus satanas*) y *Boletus venenatus* (o *Neoboletus venenata*)], *Hypholoma*, *Agaricus* (*Agaricus xanthodermus*), *Omphalotus*, *Lactarius*, *Russula*, *Entoloma*, *Chlorophyllum* (*Chlorophyllum molybdetes*) y *Leucoprinus* (*Leucoprinus birnbaumii*). Las toxinas involucradas en estos casos presentan gran variedad estructural, desde proteínas hasta terpenoides, en particular sesquiterpenoides y triterpenoides, vinilglicina, fenol y azocompuestos, pero todas presentan la misma sintomatología. Estas sustancias y otros componentes químicos de los hongos suelen ser indigestos, con una susceptibilidad variable entre los consumidores. El tratamiento es de apoyo y es estrictamente para esos casos con cuadros más graves de deshidratación. Normalmente, los casos evolucionan favorablemente después de 12 a 48 horas. Se analizan los síntomas, las toxinas involucradas, los mecanismos de acción, cuando se conocen, y las especies causantes del micetismo.

**Palabras clave:** micetismos tempranos \* síndromes gastrointestinales \* latencia muy corta \* especies de los géneros *Boletus*, *Hypholoma*, *Agaricus*, *Omphalotus*, *Lactarius*, *Russula*, *Entoloma*, *Chlorophyllum* y *Leucoprinus* \* toxinas \* tratamiento de los pacientes.

### Abstract

This part 3 of the series of four articles on mushroom poisoning refers to early-onset gastrointestinal syndromes, which are characterized by a very short latency period of less than 6 hours after mushroom ingestion. The remaining early-onset syndromes with complex symptoms will be treated in Part 4 of the series. Currently, more than 200 species responsible for gastrointestinal syndromes are known, but in this paper only ten examples will be addressed involving the genera *Boletus* [e.g., *Boletus satanas* (or *Rubroboletus satanas*), and *Boletus venenatus* (or *Neoboletus venenata*)], *Hypholoma*, *Agaricus* (e.g., *Agaricus xanthodermus*), *Omphalotus*, *Lactarius*, *Russula*, *Entoloma*, *Chlorophyllum* (e.g., *Chlorophyllum molybdetes*), and *Leucoprinus* (e.g., *Leucoprinus birnbaumii*). The toxins involved in these cases have a great structural variety, from proteins to terpenoids, in particular sesquiterpenoids and triterpenoids, vinylglycine, phenol, and azo compounds, but all show the same symptoms. These substances and other mushroom chemical constituents are usually severe indigestible, with varying consumer susceptibility. The treatment is supportive and is strictly for those cases with more severe dehydration. Usually, the cases progress favorably after 12 to 48 hours. The symptoms, toxins involved, mechanisms of action when known, and the species of mushrooms responsible for the mycetism are analyzed.

**Key words:** early-onset mycetisms \* gastrointestinal syndromes \* very short latency period \* species of the genera *Boletus*, *Hypholoma*, *Agaricus*, *Omphalotus*, *Lactarius*, *Russula*,



*Entoloma*, *Chlorophyllum*, and *Leucoprinus* \* toxins \* patient treatment.

## 1. Introducción

En esta Parte analizaremos a los síndromes tempranos del grupo 3 que comprenden toxo-síndromes gastrointestinales o resinoides, es decir que la sintomatología se basa en trastornos gastrointestinales de variada gravedad, y ocurren con un tiempo de latencia muy corto, generalmente, inferior a 6 horas después de la ingestión de los carpóforos de hongos superiores.

En el **grupo 3**, Parte 3, trataremos sobre los siguientes micetismos tempranos:

### 1) Toxi síndromes gastrointestinales o resinoides. Micetismo por irritantes gastrointestinales.

- a) Glicoproteínas (bolesatina y boleverina) y lectinas tóxicas en especies del género *Boletus*: *Boletus satanas* (o *Rubroboletus satanas*) y *Boletus venenatus* (o *Neoboletusvenenata*).
- b) Fasciculoles en especies del género *Hypholoma*.
- c) Fenol y azocompuestos en *Agaricus xanthodermus*.
- d) Triterpenos tóxicos en especies del género *Hebeloma*.
- e) Iludinas en especies del género *Omphalotus*.
- f) Sesquiterpenos cíclicos en especies de los géneros *Lactarius* y *Russula*.
- g) Vinilglicina en *Entoloma sinuatum* y otras especies de *Entoloma*.
- h) Toxina hemolítica rubescenslisina en el hongo comestible *Amanita rubescens*.
- i) Proteína tóxica en *Chlorophyllum molybdites*.
- j) Úlceras gástricas por consumo de *Leucoprinus birnbaumii*.

El **grupo 3**, Parte 4, comprende los siguientes micetismos tempranos:

- 1) Toxi síndrome muscarínico o sudoriano. Micetismo colinérgico.
- 2) Toxi síndrome inmuno-hemolítico o hemolítico. Micetismo por *Paxillus*.
- 3) Toxi síndrome neumónico alérgico. Licoperdonosis o micetismo por *Lycoperdon perlatum* y por *Pholiota nameko*.
- 4) Toxi síndrome panterínico o delirante. Micetismo por compuestos isoxazólicos o síndrome *pantherinal/muscaria*.
- 5) Toxi síndrome coprínico o cardiovascular. Micetismo inducido por alcohol o reacción tipo disulfiram.
- 6) Toxi síndrome psicotrópico o alucinogénico. Micetismo por derivados indólicos.
- 7) Toxi síndrome psicotrópico por esterilpironas y gimnopilinas. Micetismo debido al hongo alucinogénico *Gymnopilus spectabilis* o *G. junonius*.
- 8) Toxi síndrome agudo de rhabdomiólisis. Micetismo por *Russula subnigricans*.
- 9) Toxi síndrome debido a hongos cianogénicos, como *Marasmius oreades*.
- 10) Toxi síndrome inmunosupresor. Micetismo por tricotecenos macrocíclicos de *Podostroma cornu-damae*.
- 11) Toxi síndrome debido a ostreolisina de *Pleurotus ostreatus*.

### 2.1. Toxi síndromes gastrointestinales o resinoides. Micetismo por irritantes gastrointestinales:

Se conocen varias especies de hongos que producen toxo-síndromes gastrointestinales debido a que poseen compuestos que son irritantes de todo el tracto gastrointestinal, que si bien poseen componentes con estructuras químicas muy distintas, todos ellos dan lugar a síntomas similares.

Es por eso que en esta sección primero se indican los tiempos de latencia y las características sintomatológicas y luego se procede a tratar en subsecciones las toxinas, sus estructuras y mecanismos de acción, cuando se conocen, y las especies causantes del micetismo.

**Período de latencia:** Entre veinte minutos a media hora y hasta 4 horas después de la ingestión.

**Síntomatología general:** Los síntomas se manifiestan con náuseas, malestar, cólicos y vómitos, acompañados, en ocasiones, de dolores abdominales y diarrea. La mayoría de las veces estos micetismos se resuelven en uno o dos días y el pronóstico es bueno. La complicación más común es la deshidratación debido a la pérdida importante de líquidos en vómitos y diarrea, que es necesario tratar inmediatamente. Puede ser una experiencia muy desagradable. La respuesta personal en este tipo de intoxicaciones es muy variada, desde un simple dolor y ligeras molestias, hasta graves cuadros de diarrea y deshidratación.

Algunos hongos han sido causantes de intoxicaciones gastrointestinales más graves, como es el caso de *Entoloma sinuatum*, el más peligroso de todos, que se tratará en la subsección 2.1.7. y que ha provocado lesiones hepáticas graves y alteraciones nerviosas, con gran debilidad de los pacientes en el período de convalecencia, siendo mortal en ocasiones.

*Tricholoma pardinum* y *Tricholoma filamentosum* son también peligrosos y causantes de los trastornos gastrointestinales mencionados, junto a lesiones hepáticas, uremia, shock y hemorragias digestivas, dando cuadros de intoxicaciones graves, pero raramente mortales. *T. pardinum* a veces se confunde con *Tricholoma terreum* que es más grande y se encuentra en bosques altos, pero que produce un micetismo demorado con rhabdomiólisis como hemos visto en la Parte 2 de esta serie de artículos (2).

**Toxinas:** Los irritantes gastrointestinales son los que provocan la forma más común de intoxicación por ingestión de macromicetos. Para ciertas especies no se conocen todavía las sustancias que causan la intoxicación, pero en algunas de ellas, se han aislado compuestos con estructuras muy diversas, que intervienen en este tipo de trastornos gastrointestinales y que se tratarán en las subsecciones siguientes.

#### **2.1.1. Glicoproteínas (bolesatina y bolevenina) y lectinas tóxicas en especies del género *Boletus*: *Boletus satanas* (o *Rubroboletus satanas*) y *Boletus venenatus* (o *Neoboletus venenata*):**

Este micetismo es causado por especies del género *Boletus*, que es un género que en los últimos años sufrió modificaciones taxonómicas en base a consideraciones morfológicas y moleculares pasando en parte a otros géneros como *Rubroboletus*, *Neoboletus*, *Caloboletus*, *Imperator*, entre otros.

El representante más conocido causante de este síndrome es *Rubroboletus satanas* (“bolete de Satanás” o “boleteo del diablo”) que hasta 2014 fue conocido científicamente como *Boletus satanas*, descrito así por el micólogo alemán Harald Othmar Lenz en 1831, quien se sintió mal por probarlo (3,4).

El análisis genético publicado en 2013 mostró que *Boletus satanas* y muchos otros boletes (pero no todos) que formaban parte del clado *Dupainii* debían colocarse en un nuevo género (5), por lo que fue transferido a *Rubroboletus* en 2014 junto con otras especies relacionadas en base a evidencia morfológica y molecular (6).

*Rubroboletus satanas* se encuentra en suelos calcáreos en bosques mixtos en todas las zonas templadas, especialmente en el sur de Europa, en el sur de Inglaterra y en algunas islas del Mar Báltico (3), en Turquía (7), en Asia menor (8), en áreas costeras de California y sudeste de los Estados Unidos (9).

Los cuerpos fructíferos, achaparrados y de colores brillantes son grandes e imponentes, con una capucha aterciopelada de color pálido de hasta 30 cm de ancho, poros de color rojo sangre y tallos bulbosos de color rojo. La carne toma un tono grisáceo y después azul cuando se corta o se lastima. Su olor es desagradable, a carroña, más notable con la edad. Su sabor es dulce y los especímenes jóvenes tienen un agradable sabor a nueces. Es el bolete más grande que crece en Europa.

Es posible confundirlo con especies cercanas, como: a) *Boletus barrowsii*; b) *Neoboletus luridiformis*; c) *Caloboletus calopus*; d) *Rubroboletus rhodoxanthus*; e) *Rubroboletus legaliae*; f) *Imperator torosus*; g) *Rubroboletus eastwoodiae*; h) *Suillellus luridus*; i) *Imperator rhodopurpureus*, que tampoco tienen valor como comestibles, resultando indigestos o ligeramente tóxicos.

**Síntomatología:** *Rubroboletus satanas* es un hongo tóxico, que causa síntomas predominantemente gastrointestinales con náuseas y vómitos violentos, que pueden durar

hasta seis horas, y que se producen si se consumen crudos o fritos (la fritura no elimina la toxina), mientras que cocido es indigesto. También otros intoxicados presentaron náuseas, debilidad, mareos, ansiedad, visión borrosa, pérdida de audición, tinnitus y vómitos violentos (4).

Muchas veces no es consumido simplemente por su aspecto extraño y por el olor pútrido que desalienta su recolección (10). No obstante, se los ha consumido tradicionalmente en algunas regiones de Italia y en la antigua Checoslovaquia con una cocción completa. En 2012 se registraron casos de intoxicación en Suiza por ingestión de *Rubroboletus satanas*, con síntomas gastrointestinales graves, como vómitos recurrentes y diarrea con sangre (11).

**Toxinas: Bolesatina** es una potente glicoproteína monocatenaria tóxica de 63 kDa y un punto isoeléctrico *pI* de 8,3 (forma un puente disulfuro intracadena (12), que fue aislada de *Rubroboletus satanas* (12, 13). Su secuencia de aminoácidos *N*-terminal se estableció como: NH<sub>2</sub>-Thr-Trp-Arg-Ille-Tyr-Leu-Asn-Asn-Gln-Thr-Val-Lys-Leu-Ala-Leu-Leu-Leu-Pro-Asn-Gly (14). Como es una proteína no es sorprendente que el calor la desnaturalice y pierda su actividad biológica. Se estudió la distribución de bolesatina marcada con <sup>14</sup>C en ratón; poco después de la administración, quedaron marcados estómago e intestinos, riñones e hígado, y un poco más tarde bazo y pulmones (15). Se ha demostrado por monitoreo de bolesatina en fracciones subcelulares de hígado y riñón de rata que está presente en todas las fracciones: citoplasma, mitocondrias, ribosomas, microsomas, incluso en el núcleo. Bolesatina se excreta tanto por orina como por heces, y el 80% se elimina en las primeras 24 horas después de la intoxicación. Ninguna proteasa común (tripsina, quimotripsina, pronasa, proteinasa K) hidroliza a bolesatina nativa ni es desnaturalizada por calor (15).

También se aisló **muscarina** de los carpóforos, pero en cantidades demasiado pequeñas como para producir toxicidad (10).

**Bolevenina** es una proteína tóxica que se aisló del hongo tóxico *Boletus venenatus* de Japón, denominado *Neoboletus venenata* desde 2016 (16) y que presentó su actividad letal después de una inyección de 10 mg/kg en ratones (4). En SDS-PAGE, en presencia o ausencia de 2-mercaptoetanol, esta proteína mostró una única banda de ~12 kDa. Por el contrario, en base a la filtración en gel y a espectrometría de masa con ionización por desorción con láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS), su masa molecular relativa se estimó en ~30 kDa y ~33 kDa respectivamente, lo que indica que la proteína consta de tres subunidades idénticas. También se determinaron su *pI* y su secuencia de aminoácidos *N*-terminal hasta 18 que resultó similar a la de bolesatina (17).

Esta toxina corresponde a una familia de isolectinas, que mostraron una sola banda en SDS-PAGE, pero se dividieron después en ocho isolectinas mediante cromatografía de intercambio aniónico, con pesos moleculares muy similares a los obtenidos por MALDI-TOF-MS (18). Se analizó la especificidad de unión a azúcares de cada isolectina, indicando que reconocían las cadenas de azúcar unidas a *N*, especialmente los residuos Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 4Manβ1 → 4GlcNAcβ1 → 4GlcNAc (Tipo II). Las lectinas de *B. venenatus* causaron toxicidad mortal en ratones por vía intraperitoneal y la ingestión provocó toxicidad fetal y diarrea en ratones, y también diarrea en ratas (18).

**Mecanismo de acción de bolesatina:** Se demostró que bolesatina inhibe la síntesis de proteínas en varios sistemas *in vitro* e *in vivo*. Así, por ejemplo, en mitocondrias aisladas de ratas después de 90 minutos de preincubación con bolesatina se inhibió la incorporación de [<sup>14</sup>C]-leucina en las proteínas mitocondriales con una CI<sub>50</sub> (concentración de inhibición al 50%) de 530 nM (14).

Para una mejor comprensión de su mecanismo de acción sobre la síntesis de proteínas a nivel ribosómico, se trataron ribosomas de hígado de rata con bolesatina (1 a 10 µg) agregada a los sistemas de traducción de ácido poliurídico *in vitro* antes y después del lavado (19). El hecho que los ribosomas todavía estuvieran activos confirmó que la bolesatina no actúa como los inhibidores de síntesis de proteínas de origen vegetal, conocidos como proteínas inactivadoras de ribosomas. Otros estudios moleculares lo confirmaron (20).

Por estudios *in vitro* se demostró que la bolesatina tampoco tiene un efecto directo sobre los

factores de elongación, pero hidroliza los trifosfatos de nucleósidos, GTP y ATP, con la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la bolesatina debe clasificarse como una fosfatasa de trifosfatos de nucleósidos, más que un inhibidor directo de la síntesis de proteínas (19).

Cuando se administra a ratones la bolesatina causa una trombosis masiva (21) dado que tiene propiedades de lectina (22). Las lectinas forman un gran grupo de proteínas de origen no inmune que pueden reconocer y unir azúcares, tanto libres como unidos a proteínas (glicoproteínas) o a lípidos (glicolípidos), con un alto grado de especificidad. No catalizan ninguna reacción química, no muestran actividad enzimática. Las lectinas participan en muchos procesos que requieren reconocimiento específico (reacciones inmunológicas, contacto con tejidos, interacciones huésped-patógeno, etc.) y tienen potencial aplicación biotecnológica y biomédica. Las lectinas que reconocen unidades de azúcar en las paredes o en las membranas celulares alteran su fisiología y desencadenan cambios bioquímicos en la célula. Por lo tanto, una aplicación de las lectinas, como bolesatina y bolevenina, es como una herramienta para identificar glicanos aberrantes expresados por células neoplásicas y como agentes antitumorales mediante la inducción de apoptosis por diversos mecanismos (23). Se demostró que bolesatina inhibe la síntesis de proteínas *in vitro* de una manera dependiente de la concentración en una línea celular de un linfosarcoma tímico inducido por radiación (SP2/O) (24). *In vivo*, en ratones Balb/c con tumor ascítico inducido por preinyección i.p. de células SP2/O permite una remisión de 50% y 30% respectivamente. Los ratones tratados sobrevivieron 120 días después del tratamiento, es decir, 90 días después de la muerte del animal control.

La DL<sub>50</sub> (dosis letal al 50%) de bolesatina en ratones por vía oral es de 3,3 mg/kg (15); por vía intraperitoneal (i.p) en ratones o ratas es de 1 mg/kg y por vía intravenosa (i.v) es de 0,14 mg/kg (21). La bolesatina es ~100 veces menos tóxica que la ricina, pero con una DL<sub>50</sub> menor de 5 mg/kg se considera dentro de las llamadas “sustancias supertóxicas” (4).

La bolesatina, además de inhibir la síntesis de proteínas, tiene una actividad mitogénica a concentraciones muy bajas en linfocitos humanos que es unas 200 veces mayor que la de otras lectinas (25). Además, la bolesatina induce la peroxidación lipídica y activa la producción de radicales libres, contribuyendo así a la inducción de muerte celular programada (26). La bolesatina también causa aglutinación de glóbulos rojos y plaquetas (27), lo que conduce a la formación de trombos en la sangre.

**Especies causantes del micetismo:** Reino: *Fungi*; División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Boletales*; Familia: *Boletaceae*; ***Rubroboletus satanas***(Lenz) Kuan Zhao & Zhu L. Yang (6) [Basónimo: *Boletus satanas* Lenz; sinónimos: *Suillus satanas* (Lenz) Kuntze; *Tubiporus satanas* (Lenz) Maire]; ***Boletus barrowsii***Thiers & A.H. Sm.; ***Imperator rhodopurpureus*** (Smotl.) Assyov (28) [Bas.: *Boletus rhodopurpureus*(Smotl.)]; ***Imperator torosus*** (Fr.) Assyov (28) [Bas.: *B. torosus* Fr.; sin: *Dictyopus torosus* (Fr.) Quél.; *Boletus purpureus* var. *xanthocyaneus* Romagn.; *B. xanthocyaneus* (Romain) Romagn.]; ***Neoboletus luridiformis***(Rostk.) Gelardi, Simonini & Vizzini [Bas.: *Boletus luridiformis* Rostk.; sin.: *Suillus luridiformis* (Rostk.) Kuntze; *B. erythropus* Pers.]; ***Neoboletus venenatus***(Nagas) G. Wu & Zhu L. Yang (16) [Bas.: *Boletus venenosus* Nagas]; ***Caloboletus calopus*** (Pers.) Vizzini; ***Rubroboletus eastwoodiae*** (Murrill) Arora, Schwarz & Frank (*Boletus eastwoodiae* Murrill hasta 2015); ***Rubroboletus legaliae***(Pilát & Dermek) Della Maggiora & Trassinelli (29) [Bas.: *Boletus legaliae* Pilát; Sin: *B. splendidus* C.Martín; *B. spinari* Hlaváček]; ***Rubroboletus rhodoxanthus*** (Krombh.) Kuan Zhao & Zhu L. Yang (6) conocido como *B. rhodoxanthus* hasta 2014 [Sin: *B. sanguineus* var. *rhodoxanthus* Krombh.]; ***Suillellus luridus*** (Schaeff.) Murrill [Bas.=*Boletus luridus* Schaeff.; sin: *B. rubeolarius* Bull.; *B. subvescus* J.F.Gmel.; *Leccinum luridum* (Schaeff.) Gray; *Tubiporus luridus* (Schaeff.) P.Karst.; *Dictyopus luridus* (Schaeff.) Quél.].

### 2.1.2. Fasciculoles en especies del género *Hypholoma*:

El hongo basidiomiceto *Hypholoma fasciculare* es el responsable de este síndrome gastrointestinal. Es tóxico, tiene sabor amargo y emite un olor desagradable, como a iodo o azufre. Suele encontrarse en grandes grupos principalmente sobre tocones de coníferas o de

árboles caducifolios. Tiene importancia forestal, ya que su micelio, principalmente saprófito se alimenta degradando la madera caducifolia en descomposición debido a su menor contenido de lignina en relación con la de coníferas (30). Además de la madera muerta, también infesta árboles vivos y hace que mueran en unos pocos años.

*Hypholoma fasciculare* es uno de los hongos más comunes en los bosques de Europa, es el más frecuente en Gran Bretaña y abundante en el norte de Europa, Irán, Turquía (7), en Asia (Japón, China y Corea), en América del Norte y en América del Sur, especialmente en Argentina. Otras especies de *Hypholoma* crecen en Colombia y Brasil. Se ha utilizado con éxito en silvicultura como un tratamiento experimental para desplazar competitivamente una enfermedad fúngica común de las coníferas, *Armillaria solidipes*, en bosques de coníferas (31).

Hay muchas especies de *Hypholoma* relacionadas, como: *Hypholoma capnoides*, que es comestible, así como *H. sublateralitium* tóxica e *H. epixanthum* tóxica.

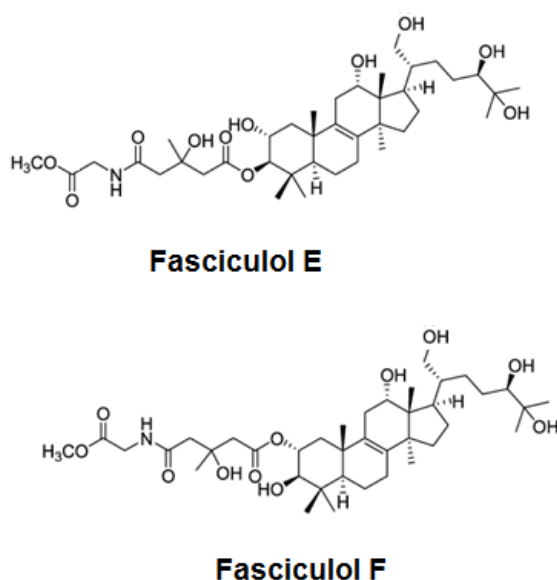
**Sintomatología:** Los síntomas por ingestión de *Hypholoma fasciculare* pueden retrasarse de 5 a 10 horas tras el consumo, después de lo cual puede haber diarrea, náuseas, vómitos, proteinuria y colapso. Se han registrado parálisis y problemas de visión. Los síntomas generalmente se resuelven en unos pocos días.

Sus toxinas (fasciculoles) actúan sobre el estómago y el intestino delgado y provocan vómitos y diarrea; sin embargo, no ocurre daño permanente. Hace algún tiempo se creía que el hongo era mortalmente tóxico, ya que los compuestos tóxicos causaron parálisis y muerte en ratones. Hasta ahora, no se ha demostrado un efecto similar en humanos.

Un extracto de *Hypholoma fasciculare* presentó actividad inhibidora sobre la trombina (32).

**Toxinas:** Este hongo es bien conocido por sus diversos componentes terpenoidales (**ergosteroles**, **triterpenoides** y **sesquiterpenoides**) (33-37), y particularmente por la presencia de **triterpenoides con esqueleto de lanostano** (lanosteroides) como componentes tóxicos (33-35, 38, 39). Estos lanostanos inhiben el crecimiento de las plántulas de repollo chino y tienen actividad antimicrobiana y de inhibición de calmodulina (33-35).

En 1983 se aislaron e identificaron los lanostanos tóxicos: **fasciculol E** y **fasciculol F** (Fig. 1) de los carpóforos de *Hypholoma fasciculare* o *Naematoloma fasciculare*, que causaron parálisis y muerte en ratones, con valores de DL<sub>50</sub> en ratones de 50 mg/kg y 168 mg/kg (i.p.) respectivamente (33).



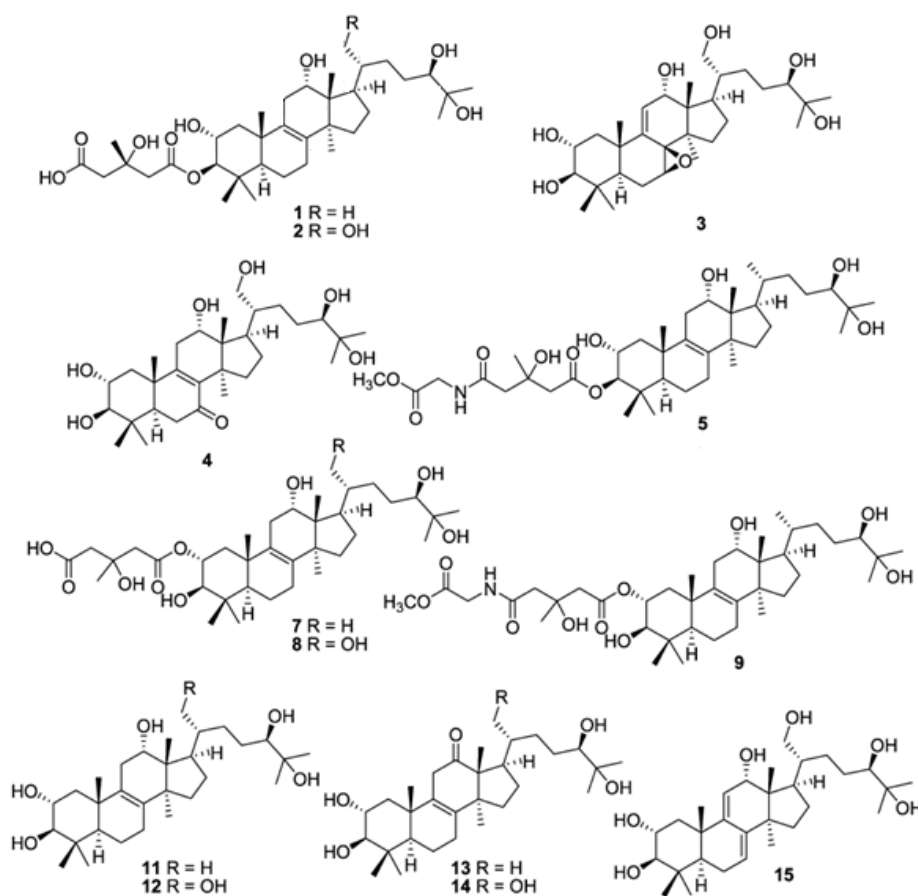
**Figura 1:** Estructuras químicas de fasciculol E y fasciculol F.

Se aislaron 15 triterpenoides tipo lanostano (lanosteroides) (1-15) (Figs. 1 y 2) del extracto metanólico de *Hypholoma fasciculare* (39): Fasciculol J (1), fasciculol K (2), fasciculol L (3),

fasciculol M (**4**) y fasciculol G (**5**) (Fig. 2), fasciculol E (**6**) (35), ácido fascicúlico B (**7**) (35), ácido fascicúlico F (**8**), fasciculol D (**9**), fasciculol F (**10**), fasciculol B (**11**), fasciculol C (**12**), fasciculol H (**13**) (38), fasciculol I (**14**) (38) y sublateriol C (**15**) (40) (Figs. 1 y 2).

Todos los triterpenoides aislados (Figs. 1 y 2), excepto **1** y **2**, mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer humano A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 y HCT-15 con valores de  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria al 50%) de 2,29-9,86  $\mu$ M. Los compuestos **11**, **12** y **15** mostraron una considerable citotoxicidad contra estas líneas celulares, destacándose la actividad del compuesto **12** ( $CI_{50}$ : 2,37, 2,82, 2,29 y 3,06  $\mu$ M respectivamente) (39).

La presencia de un grupo 3-hidroxi-3-metilglutarilo unido a C-3 en los compuestos **1** y **2** redujo la actividad marcadamente en comparación con los compuestos **7** y **8**, con la cadena lateral conectada a C-2. Los compuestos **13** y **14**, con una funcionalidad de cetona en C-12, presentaron una buena citotoxicidad selectiva contra la línea celular SK-OV-3 [ $CI_{50}$  (**13**): 9,86;  $CI_{50}$  (**14**): 7,98  $\mu$ M] (39).



**Figura 2:** Estructuras químicas de los compuestos triterpénicos tipo lanostano **1-5**, **7-9** y **11-15**.

Considerando que la progresión del cáncer está asociada con respuestas inflamatorias, también se evaluó la actividad antiinflamatoria de quince lanosteroides, examinando sus efectos inhibidores sobre la producción de óxido nítrico en una línea celular microglial murina activada por lipopolisacárido. Entre los compuestos ensayados, sólo **4** y **7** inhibieron moderadamente la producción de óxido nítrico, sin toxicidad celular (39).

También de los carpóforos de *Hypholoma fasciculare* se aislaron **ergosterol**, **peróxido de ergosterol** (5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-22*E*-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol; contenido muy alto: al menos 0,23%) (36) y tres derivados de ergosterol: (22*E*,24*R*)-ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -tetrol, (22*E*,24*R*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido y (22*E*,24*R*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-ergosta-6,9,22-trien-3 $\beta$ -ol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido. Se analizó su actividad citotóxica frente a cuatro líneas celulares de cáncer humano (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 y



HCT-15) (41).

**Mecanismo de acción:** Varios lanosteroides detienen el ciclo celular en G<sub>1</sub> o en G<sub>2</sub>/M, afectan a las proteínas transportadoras MDR y MRP, aumentan los niveles de p53 y Bax, disminuyen la expresión de MMP, inducen apoptosis, o inhiben no sólo la fosforilación de Erk1/2, sino también la activación de NF-κB y AP-1 (42). Por lo tanto, parece que los compuestos activos 3-15 (Figs. 1 y 2) de *H. fasciculare* pueden ser valiosos en estudios posteriores abordando su mecanismo citotóxico y para experimentos *in vivo*.

También los fasciculoles de *H. fasciculare* resultaron ser inhibidores de calmodulina (34), en particular los ácidos fascicúlicos A, B y C presentaron potente actividad antagonista de calmodulina (35).

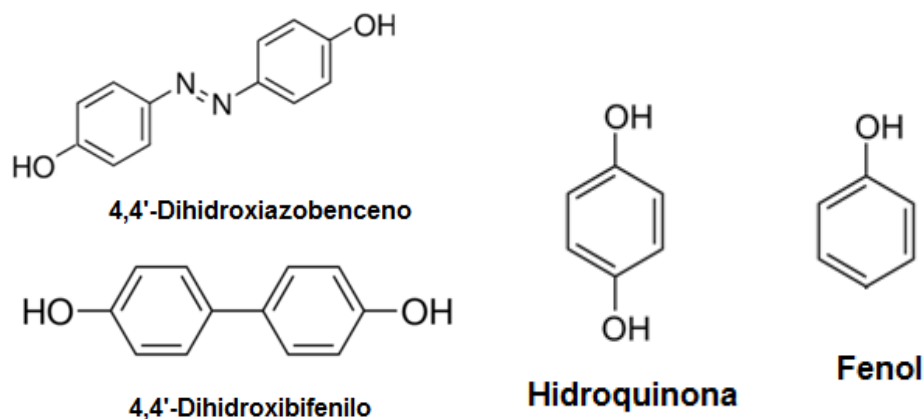
El peróxido de ergosterol y el ergosterol tienen acción antiviral y antitumoral, pero además mostraron una actividad anticomplementaria muy fuerte en la ruta clásica, con valores de CI<sub>50</sub> de 5,0 μM y 1,0 μM respectivamente (36). El sistema del complemento consiste en más de 20 proteínas séricas, que se activan mediante un mecanismo en cascada de la vía clásica o de la vía alternativa. Desempeña un rol importante en la defensa del huésped, la inflamación y las reacciones alérgicas. El peróxido de ergosterol es un esteroide de C<sub>28</sub> que presenta actividad antimicrobiana, citotóxica, inmunosupresora y otras que han sido compiladas recientemente, junto con su mecanismo de acción (43).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Strophariaceae*; ***Hypholoma fasciculare*** (Huds.) P. Kumm. [Bas: *Agaricus fascicularis* Huds.; sin.: *Naematoloma fasciculare* (Huds.) P. Karst.] crece en Argentina (provincias de Salta, Tucumán, Entre Ríos y Buenos Aires) (44, 45) y en Brasil (46); ***Hypholoma epixanthum*** (Fr.) Quél. [Bas: *Agaricus epixanthus* Fr.; sin.: *Naematoloma epixanthum* (Fr.) P. Karst., *N. epixanthum* (Fr.) P. Karst., *Geophila epixantha* (Fries) Quél., *Hypholoma radicosum* J.E. Lange, *N. radicosum* (J.E. Lange) Konrad & Maubl., *Psilocybe radicosum* (J.E. Lange) Noordel.]; ***Hypholoma fasciculare* var. *mitis*** Raithelh. crece en Argentina (provincias de Neuquén y Río Negro) (45, 46); ***Hypholoma lateritium*** (Schaeff.) P. Kumm. crece en Argentina, Chile y Colombia (44, 46, 47); ***Hypholoma sublateritium*** (Schaeff.) Quél. [Bas: *Agaricus sublateritius* Schaeff.; sin.: *Naematoloma sublateritium* (Schaeff.) P. Karst.] crece en Argentina (Buenos Aires y Tierra del Fuego) (45, 48); ***Hypholoma sublateritium* var. *aranoides*** Raithelh. crece en Argentina (45, 46).

### 2.1.3. Fenol y azocompuestos en *Agaricus xanthodermus*:

*Agaricus xanthodermus* es un hongo saprotrófico basidiomiceto responsable de un síndrome gastrointestinal. Está extendido en el Norte de África, Asia, Europa, América del Norte y América del Sur; se encuentra en Argentina. Aparece en pequeños grupos en jardines y en los lugares donde hay hojas en descomposición, troncos, tocones, especialmente de coníferas. Su carne es blanca y su olor es fuerte y desagradable.

**Sintomatología:** Problemas digestivos. Los síntomas pueden incluir calambres abdominales, náuseas y diarrea; menos comúnmente dolor de cabeza, mareos, sudoración y somnolencia.



**Figura 3:** Estructuras químicas de 4,4'-dihidroxi-azobenceno, 4,4'-dihidroxi-bifenilo, hidroquinona y fenol.

**Toxinas:** Los esporóforos frescos de *Agaricus xanthodermus* produjeron **4,4'-dihidroxi-azobenceno**, **fenol**, **p-quinol** (=hidroquinona) y **4,4'-dihidroxibifenilo** (Fig. 3) (49). Fue la primera vez que se encontró un compuesto azo endógenamente en la naturaleza, mientras que los restantes compuestos no se habían aislado previamente de hongos superiores. El fenol está presente en *A. xanthodermus* en una concentración suficientemente alta como para dar cuenta de su toxicidad (49). Todos estos compuestos son tóxicos y resulta llamativa su presencia en la naturaleza.

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Agaricaceae*; ***Agaricus xanthodermus*** Genev. [Sin.: *Pratella xanthoderma* (Genev.) Gillet; *Psalliota xanthoderma* (Genev.) Richon & Roze; *Fungus xanthodermus* (Genev.) Kuntze] crece en Argentina (provincias de Buenos Aires, Tucumán, Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego); también en Buenos Aires crece ***Agaricus xanthodermus* var. *croceus*** Raithelh. (48, 50).

#### 2.1.4. Triterpenos tóxicos en especies del género *Hebeloma*:

Las especies de *Hebeloma* que producen trastornos gastrointestinales por ingestión de sus carpóforos son: *Hebeloma vinosophyllum*, *H. crustuliniforme*, *H. sinapizans*, *H. spoliatum*, *H. senescens* y *H. versipelle* (51).

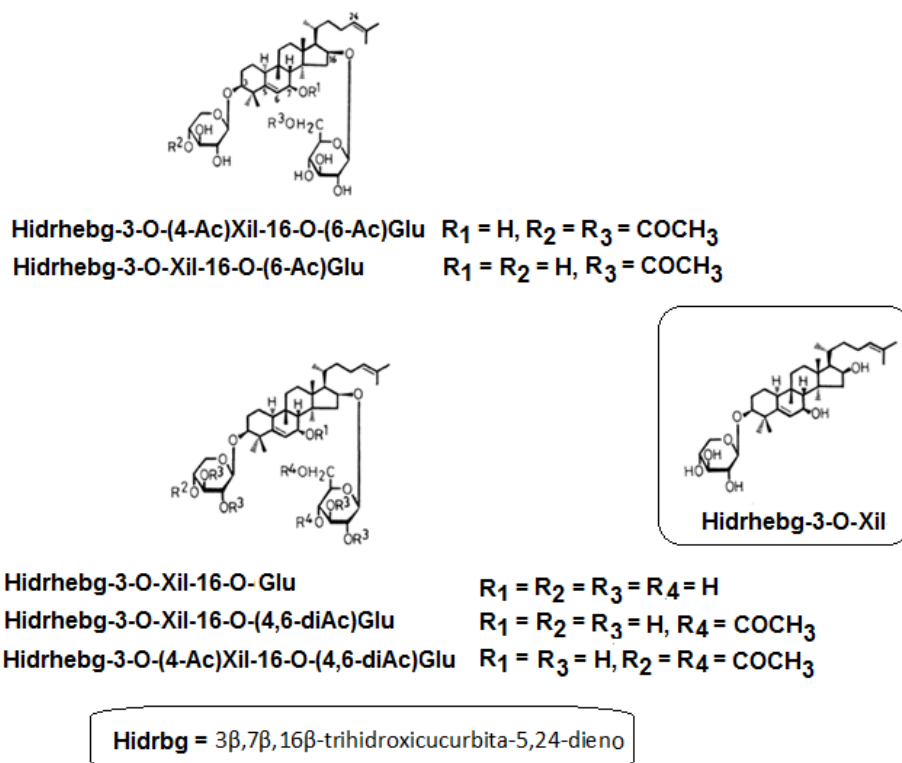
*Hebeloma vinosophyllum* es un hongo tóxico que crece en Asia, descrito por el micólogo japonés Tsuguo Hongo en 1965, que se registró por primera vez en el sudeste asiático en los bosques vietnamitas de *Pinus kesiya* en 2014 (52). Es un hongo amoniacal (desarrolla carpóforos en suelos con amoníaco agregado u otros materiales que contienen nitrógeno) que tiende a crecer en los cadáveres de animales.

*Hebeloma sinapizans* y *H. crustuliniforme* son hongos tóxicos que crecen principalmente en Europa y América del Norte (30), pero *H. crustuliniforme* crece también en América del Sur, como por ejemplo Argentina (44, 53). Ambas especies crecen bajo árboles frondosos, bosques caducifolios y de coníferas. Estos hongos tienen un olor y sabor parecido al rábano, aunque *H. crustuliniforme* es más amargo.

*Hebeloma velutipes* es uno de los miembros más comunes y abundantes del género y *H. sinapizans* es una de sus especies más antigua y más frecuentemente registrada. Usando grandes tamaños de muestras, varios loci y el análisis de tipos, recientemente se exploró la taxonomía, los límites de las especies europeas, la distribución y la clasificación infragenérica de estas dos especies y sus parientes (54). Los resultados filogenéticos son congruentes con respecto a la delimitación de especies, pero sugieren historias evolutivas conflictivas en su filogenia. Se evaluó el respaldo filogenético para las secciones y se describieron los caracteres morfológicos utilizados para distinguir las diez especies europeas reconocidas (54).

**Toxinas:** Se aislaron **glicósidos triterpénicos de tipo cucurbitano**, llamados **hebevinósidos**, como compuestos **tóxicos** de *Hebeloma vinosophyllum* (55-57) y **triterpenos de tipo lanostano tóxicos** de *Hebeloma crustuliniforme*, *H. sinapizans* y *H. spoliatum* (58).





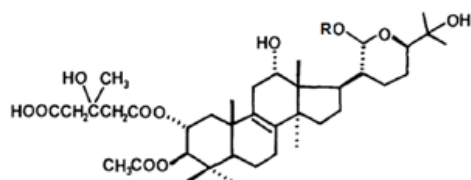
**Figura 4:** Estructuras químicas de los glicósidos triterpénicos con esqueleto tipo cucurbitano (hebevinósidos) de *Hebeloma vinosophyllum*.

Los **hebevinósidos** de los carpóforos de *Hebeloma vinosophyllum* (55, 56), fueron identificados como: 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxicucurbita-5,24-dien-3-*O*-(4-*O*-acetil)- $\beta$ -*D*-xilopiranosido-16-*O*-(6-*O*-acetil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosido [**Hidrhebg-3-*O*-(4-Ac)Xil-16-*O*-(6-Ac)Glu**], 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxicucurbita-5,24-dien-3-*O*- $\beta$ -*D*-xilopiranosido-16-*O*-(6-*O*-acetil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosido [**Hidrhebg-3-*O*-Xil-16-*O*-(6-Ac)Glu**], 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxi-cucurbita-5,24-dien-3-*O*- $\beta$ -*D*-xilopiranosido-16-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido [**Hidrhebg-3-*O*-Xil-16-*O*-Glu**], 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxicucurbita-5,24-dien-3-*O*- $\beta$ -*D*-xilopiranosido-16-*O*-(4,6-di-*O*-acetil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosido [**Hidrhebg-3-*O*-Xil-16-*O*-(4,6-diAc)Glu**], 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxicucurbita-5,24-dien-3-*O*-(4-*O*-acetil)- $\beta$ -*D*-xilopiranosido-16-*O*-(4,6-di-*O*-acetil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosido [**Hidrhebg-3-*O*-(4-Ac)Xil-16-*O*-(4,6-diAc)Glu**] y 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxicucurbita-5,24-dien-3-*O*- $\beta$ -*D*-xilopiranosido [**Hidrhebg-3-*O*-Xil**] (Fig. 4). La aglicona común para todos ellos es 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihydroxicucurbita-5,24-dieno (**hidroxihebevinogenina**: Hidrhebg) (Fig. 4).

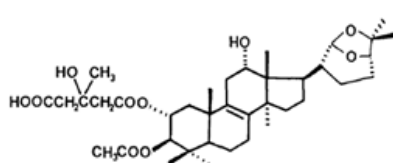
Se demostró que la xilosa y la glucosa de los hebevinósidos pertenecen a la serie *D*. También se investigó la relación entre la estructura y la toxicidad de los hebevinósidos. El compuesto tóxico 3 $\beta$ -acetil-2 $\alpha$ -(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilcrustulinol (**ácido hebelómico**) (Fig. 5) se aisló de los carpóforos de *Hebeloma crustuliniforme* y de *H. sinapizans*, el cual resultó citotóxico (59).

Se aisló además el **ácido hebelómico** con otros dos **triterpenos de tipo lanostano** de carpóforos de *Hebeloma spoliatum*, como los principios tóxicos fatales y se identificaron como: 3,21-diacetil-2-(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilcrustulinol y 3 $\beta$ -acetil-2 $\alpha$ -(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilanhidrocrustulinol (Fig. 5) (58).

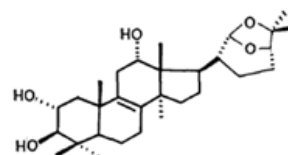
También se obtuvieron triterpenos tipo lanostano de carpóforos de *Hebeloma senescens* (60) y de *Hebeloma versipelle* (61).



**Ácido hebelómico** R = H  
**3,21-Diacetil-2-(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilcrustulinol** R = Ac



**3β-Acetil-2α-(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilanhidrocrustulinol**



**Anhidrocrustulinol**

**Figura 5:** Estructuras químicas de triterpenos de tipo lanostano de *Hebeloma crustuliniforme*, *H. sinapizans* y *H. spoliatum*

**Ensayos en ratones con los glicósidos triterpénicos de tipo cucurbitano:** Por administración i.p. por separado en ratones de 100 mg/kg de los dos glicósidos: Hidrhebg-3-*O*-(4-Ac)Xil-16-*O*-(6-Ac)Glu e Hidrhebg-3-*O*-Xil-16-*O*-(6-Ac)Glu (Fig. 4), cuatro de cinco ratones murieron tras parálisis. Se demostró, inyectando diferentes glicósidos, que la sustitución de un grupo hidroxilo de la posición 7β con un grupo metoxilo aumenta la toxicidad de los hebevinósidos (58).

Al administrar i.p. 100 mg/kg de Hidrhebg-3-*O*-Xil-16-*O*-Glu (Fig. 4), los cuatro ratones murieron tras parálisis, pero, con 50 mg/kg de este glicósido, sobrevivieron los cinco ratones; su valor de DL<sub>50</sub> en ratones (i.p) fue de 66 mg/kg. Al administrar i.p. 200 mg/kg de uno de los glicósidos con una unidad 3-xilosilo, un 7-metoxilo y un 16-hidroxilo, sobrevivieron los cinco ratones (58).

Por otro lado, al administrar 100 mg/kg de un glicósido parcialmente hidrolizado y desacetilado, con un 3-hidroxilo, un 7-etoxilo y un 16-glucosilo, los tres ratones murieron tras parálisis. Este resultado sugiere que la presencia de un 16-glucosilo en los hebevinósidos es indispensable para que haya toxicidad.

**Ensayos en ratones con los triterpenos de tipo lanostano:** Una dosis de 100 mg/kg de ácido hebelómico, 3,21-diacetil-2-(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilcrustulinol y 3β-acetil-2α-(3'-hidroxi-3'-metil)glutarilanhidrocrustulinol (Fig. 5) en ratones por vía i.p. causó la muerte tras parálisis de las extremidades inferiores (58).

**Mecanismo de acción:** Los triterpenos de tipo lanostano causaron la relajación del intestino delgado de ratón, contraído por tratamiento con cloruro de acetilcolina o cloruro de bario *in vitro*. Estos lanosteroides parecen presentar un efecto de relajación similar a papaverina (58).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Cortinariaceae* (*Hymenogastraceae* o *Strophariaceae* según la clasificación); *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quél. [Bas.: *Agaricus crustuliniformis* Bull.] crece en Europa, Australia, América del Norte y en América del Sur en Argentina (Buenos Aires) (44, 53); *Hebeloma vinosophyllum* Hongo; *Hebeloma spoliatum* (Fr.) Gillet; *Hebeloma sinapizans* (Paulet) Gillet [Bas.: *Hypophyllum sinapizans* Paulet; sin.: *Agaricus sinapizans* (Paulet) Fr.; *Hebeloma sinapizans* (Paulet) Sacc.; *H. sinapizans* (Fr.) Sacc.] crece en Europa y América del Norte; *Hebeloma versipelle* (Fr.) Gillet crece en Europa (51, 54).

### 2.1.5. Iludinas en especies del género *Omphalotus*:

Las especies del género cosmopolita *Omphalotus* son tóxicas y tienen como característica la bioluminiscencia de sus láminas que da una luminosidad verdosa o azul-verdosa en la oscuridad, que se debe a la enzima luciferasa, que actúa sobre el compuesto luciferina, que conduce a la emisión de luz al igual que las luciérnagas (62). Los carpóforos carnosos tienen un tallo excéntrico que hace que el sombrero, de color anaranjado con diversos tintes según la especie, tenga forma de riñón o abanico.

Las especies de *Omphalotus* causan una putrefacción blanca al romper la lignina en sus árboles huéspedes (63); el hongo penetra en el duramen del árbol a través de una fisura en su corteza, ya sea por una rama que cae, daños causados por insectos o por daños mecánicos de la tala. Es decir que estos hongos desempeñan un papel importante en la descomposición de la madera y el reciclaje de los nutrientes en el suelo.

Varias especies de *Omphalotus* con propiedades bioluminiscentes similares ocurren en todo el mundo, todas las cuales se presumen tóxicas. Las especies más conocidas son *Omphalotus olearius* (“seta de olivo”, “jack-o'-lantern”) que crece como parásito o saprobioótico en tocones en descomposición, en raíces enterradas o en la base de árboles de hoja caduca (olivos, robles o castañas) en áreas boscosas de Europa, especialmente en zonas de clima mediterráneo y en Sudáfrica (64) y *O. illudens* (“jack-o'-lantern”) que es una especie morfológicamente similar, pero filogenéticamente distinta (63), proveniente del este de América del Norte. También se destacan *O. nidiformis* (“hongo fantasma”) que es tanto saprotrófico como parasitario que crece en grupos superpuestos en una amplia variedad de árboles muertos o moribundos, en especial de eucaliptos, acacias, casuarinas y pinos, del sur de Australia y de Tasmania (65) y que se registró en India en 2012 creciendo bajo un tocón de cocotero (66), *O. olivascens* (“jack-o'-lantern occidental”) por análisis molecular muy relacionado con *O. nidiformis* (63) se encuentra en el sur y centro de California y en Méjico (67) y, por último, *O. japonicus* (“tsukiyotake”) (68-70) que crece en la madera de haya en descomposición (71) en las regiones montañosas de Japón, en Corea (72), China (73) y el este de Rusia, y está más estrechamente relacionado con un clado compuesto por *O. nidiformis*, *O. olivascens* y *O. olearius* según un estudio molecular de 2004 (63). *O. japonicus* fue responsable del 31,6% de los casos de intoxicación en Japón entre 1996 y 2005, más que cualquier otro hongo (74).

Todas estas especies son bioluminiscentes y tóxicas, conteniendo las mismas toxinas (63).

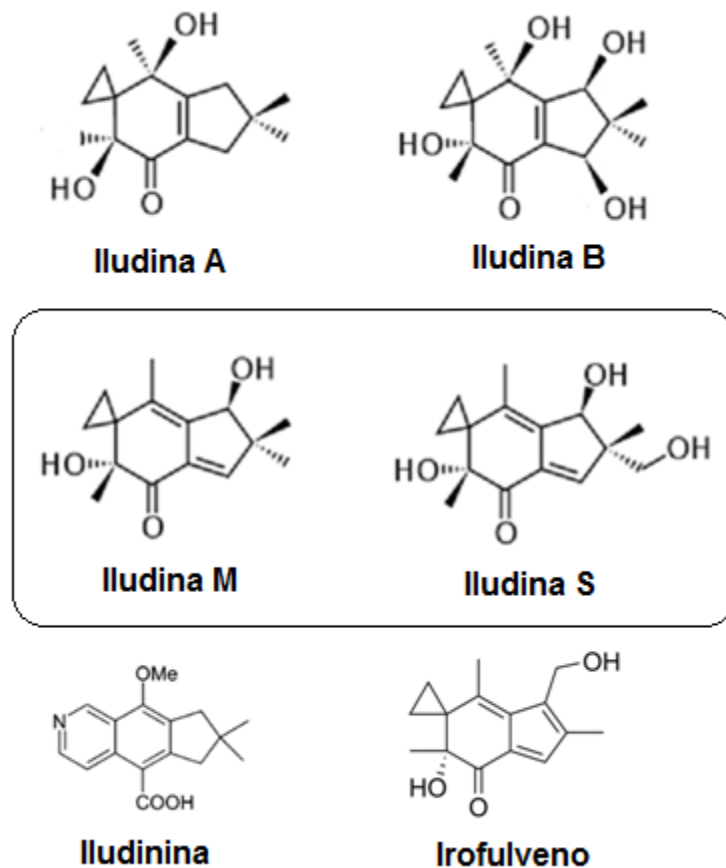
**Síntomatología:** Aunque no son letales, *Omphalotus olearius*, *O. illudens*, *O. olivascens* y *O. japonicus* producen cólicos, vómitos y diarrea severos. Al consumir *O. olearius* predominan los vértigos, mareos, parestesias, lipotimias y relajación muscular. *O. nidiformis* induce vómitos, que generalmente se producen entre 30 minutos y dos horas después del consumo y duran varias horas; no se presenta diarrea y los pacientes se recuperan sin secuelas duraderas. El tratamiento más común es la terapia de fluidos (75, 76).

**Toxinas:** Las **iludinas** son una familia de sesquiterpenos muy tóxicos con una subestructura de espirociclopropano, que presentan propiedades antibióticas y antitumorales (77); son responsables de los efectos nocivos causados por varias especies de *Omphalotus* cuando se consumen crudas o cocidas.

En 1963, las estructuras de **iludinas M** y **S** (Fig. 6) se asignaron totalmente (78). Los compuestos estructuralmente relacionados, **iludina A** y **B** (Fig. 6), se identificaron en 1991 como antibacterianos de *Clitocybe illudens* (= *Omphalotus olearius*) (79). También del cultivo de esta especie se aisló **iludinina** (Fig. 6), que es un alcaloide sesquiterpenoidal (80).

Iludina S junto con iludina M e **iludosina**, han sido identificados en *O. illudens* (77). Los carpóforos de *O. japonicus* (81-83) y de *O. nidiformis* (84) también contienen iludinas S y M, junto con **iludinas F, G** y **H** (85).

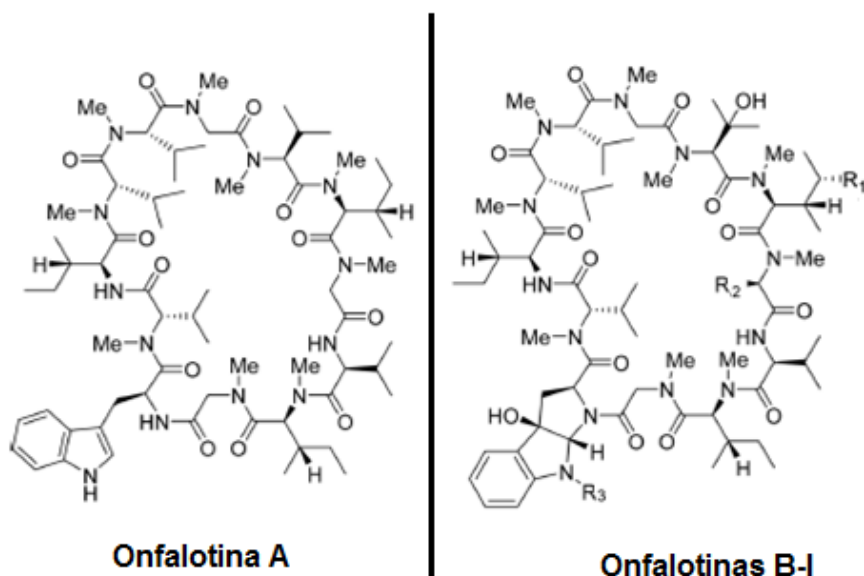
*O. nidiformis* mostró toxicidad marcada en cultivos celulares de cáncer gástrico (AGS), de colon (HT-29) y de mama independiente de estrógeno (MDA-MB-231) (86).



**Figura 6:** Estructuras químicas de iludina A, B, M y S, iludinina e irofulveno.

Las iludinas S y M presentan efectos antibacterianos y antifúngicos; son comunes al género *Omphalotus* y no se encuentran en ningún otro hongo basidiomiceto (84).

Los micelios de los cultivos sumergidos de *Omphalotus olearius* produjeron también dodecapéptidos cíclicos nematocidas, denominados **onfalotinas A-I** (Fig. 7), que no están presentes en los carpóforos (87-89). El compuesto principal es **onfalotina A** (Fig. 7), que es un aceite incoloro que permanece estable durante el aislamiento y el almacenamiento; contiene una alta proporción de *L*-aminoácidos metilados, como sarcosina (metilglicina), metilvalina y metilisoleucina. Estas onfalotinas presentan una actividad fuerte y selectiva contra nematodos fitopatógenos como *Meloidogyne incognita*, de importancia económica, con valores DL<sub>50</sub> entre 0,5 y 2,0 µg/mL (90) (onfalotina A presentó DL<sub>50</sub> = 2 µg/mL; diez veces más potente que ivermectina). Los efectos citotóxicos fueron comparativamente débiles (87-89).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Onfalotina B</b>	O <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> C(Me) <sub>2</sub> OH	OH	H
<b>Onfalotina C</b>	O <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> C(Me) <sub>2</sub> OH	OAc	H
<b>Onfalotina D</b>	OAc	OAc	H
<b>Onfalotina E</b>	H	H	H
<b>Onfalotina F</b>	H	H	OH
<b>Onfalotina G</b>	H	OH	OH
<b>Onfalotina H</b>	OAc	OAc	OH
<b>Onfalotina I</b>	O <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> C(Me) <sub>2</sub> OH	OAc	OH

**Figura 7:** Estructuras químicas de las onfalotinas A-I.

**Mecanismo de acción:** Las **iludinas** son agentes alquilantes del ADN (91). Dentro de las células, la iludina S (Fig. 6) reacciona con el ADN y lo daña, lo cual bloquea el proceso de transcripción. Este bloqueo sólo puede aliviarse mediante el sistema de reparación de ADN mediante escisión de nucleótidos. La célula deja sin reparar el daño en las áreas no transcritas del ADN.

El efecto citotóxico de iludina es de interés para tratar algunos cánceres, pero es demasiado tóxica para su uso directo, por lo que primero debe modificarse químicamente. El **irofulveno** o **6-hidroximetilacilfulveno**, un derivado semisintético de iludina S desarrollado por la compañía MGI Pharma, está pasando por la fase II de ensayos clínicos comotratamiento potencial de tumores refractarios y recidivantes, incluidos los cánceres de ovario, próstata, hepatocelular, de mama, pulmón y colon(92-94), pero debido a sus efectos secundarios hematológicos, aún debe ser aprobado para uso clínico.

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Marasmiaceae* (*Omphalotaceae* en desuso): ***Omphalotus olearius***(DC.) Sing. [Bas: *Agaricus olearius* DC.; sin.: *A. olearius* subsp. *phosphoreus* Battarra ex Pers., *Dryophila phosphorea* (Battarra ex Pers.) Quél., *Clitocybe olearia* (DC.) Maire, *Clitocybe phosphorea* (Battarra ex Pers.) Bohus] (95); ***Omphalotus illudens***(Schwein.) Bresinsky & Besl [Bas.: *Agaricus illudens* Schwein.; sin.: *Panus illudens* (Schwein.) Fr., *Clitocybe illudens* (Schwein.) Sacc., *Lentinus illudens* (Schwein.) Henn., *Pocillaria illudens* (Schwein.) Kuntze, *Monodelphus illudens* (Schwein.) Earle, *Omphalotus olearius* var.

*illudens* (Schwein.) A. Ortega & Esteve-Rav. (96)]; *Omphalotus nidiformis* (Berk.) O.K. Mill.; *Omphalotus olivascens* H.E. Bigelow, O.K. Mill. & Thiers; *Omphalotus japonicus* (Kawam.) Kirchn. & O.K. Mill. [Bas.: *Pleurotus japonicus* Kawam.; sin.: *Armillaria japonica* (Kawam.) S. Imai; *Pleurotus harmandii* Har. & Pat.; *Lampteromyces japonicus* (Kawam.) Singer; *Omphalotus guepiniformis* (Berk.) Neda].

#### 2.1.6. Sesquiterpenos cíclicos en especies de los géneros *Lactarius* y *Russula*:

Una característica general de las especies del género *Lactarius* ("niscalos") es que los carpóforos contienen un látex o jugo acuoso lechoso que expulsan al cortarlos cuando están frescos y que cambia de color en contacto con el aire. Este látex fluye por un sistema de tubos laticíferos que se ramifican por todos los tejidos del esporóforo. El color y el sabor de este látex varían entre las diferentes especies, siendo de gran importancia taxonómica.

El látex contiene una variedad de sesquiterpenos que a mayor número de insaturaciones químicas dará lugar a mayor intensidad en el color. Se han aislado sesquiterpenos con esqueletos de lactarano, *secō*-lactarano (abierto el anillo de siete miembros) y marasmano de los carpóforos de especies de los géneros *Lactarius* y *Russula*. Estos sesquiterpenos desempeñan una función de defensa química, contra los depredadores y es por eso que presentan fuerte actividad antimicrobiana, mutagénica y antialimentaria o antifeedant, pero además son tóxicos para los humanos.

**Sintomatología:** Los síntomas por ingestión de *Lactarius helvus* aparecen dentro de los treinta minutos posteriores al consumo, con náuseas y vómitos acompañados de vértigo y escalofríos. En octubre de 1949, 418 personas se intoxicaron con *L. helvus* cerca de Leipzig en el este de Alemania (97).

Las toxinas se destruyen mediante ebullición profunda, y *L. helvus* se usa en pequeñas cantidades como especia después del secado.

*L. torminosus* se caracteriza por su sabor intensamente picante cuando se consume crudo y, en exceso, puede provocar ampollas en la lengua (98). Su toxicidad se limita a un síndrome gastrointestinal debido a la presencia en el hongo de sustancias no absorbibles, pero irritantes para el tubo digestivo. Los síntomas que se experimentan tras consumir carpóforos crudos son náuseas, diarreas severas, vómitos y dolor abdominal que aparecen entre 15 minutos y tres horas después de la ingestión. Esto puede conducir a deshidratación, espasmo muscular y colapso circulatorio. Aún así, ocupan una parte muy baja en la escala de peligrosidad; de hecho, la gastroenteritis generalmente se resuelve sin tratamiento en un par de días (99). Esta especie se consume en Finlandia, Rusia y otros países de Europa septentrional y oriental, tras una cocción inicial y varios días de remojo en salmuera.

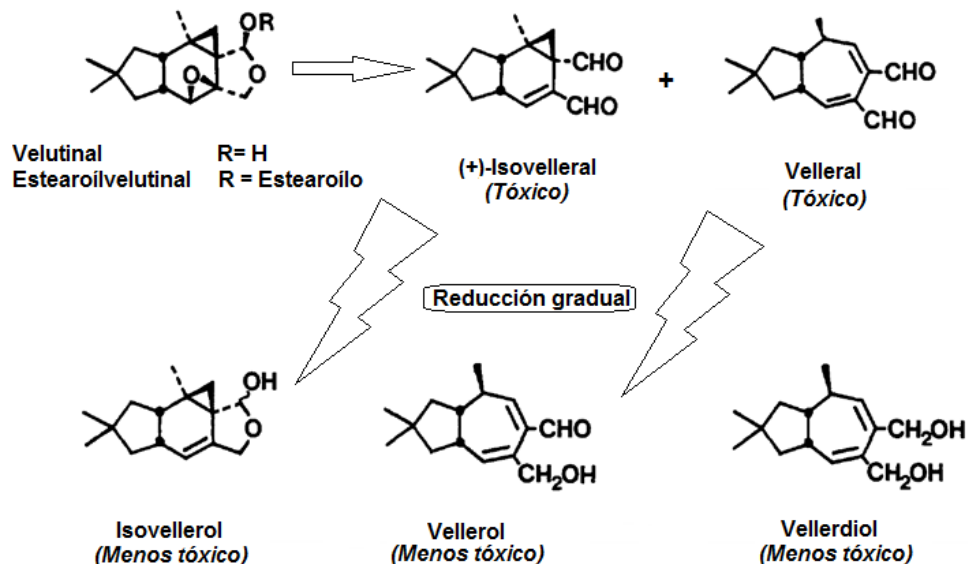
*L. necator* ha causado varios casos de gastroenteritis, probablemente debido a insuficiente pre-tratamiento, como salazón y/o sancochado (10, 64, 100).

Se considera que *Lactarius rufus* es un hongo comestible, después del tratamiento previo apropiado. Su consumo ha dado lugar a varios casos de gastroenteritis, probablemente debido a un pretratamiento no adecuado (10, 64, 100).

**Toxinas:** Son **sesquiterpenos** con diferente esqueleto y distinta concentración, y también según los procedimientos y el solvente de extracción; así, al usar etanol se obtuvieron éteres etílicos como compuestos no originales de los carpóforos.

Bajo condiciones bien controladas en las etapas de extracción y aislamiento, se obtuvo **estearoílvolutinal** (éster de ácido esteárico del sesquiterpeno **velutinal** muy inestable) (Fig. 8) como único sesquiterpeno de carpóforos de *Lactarius vellereus* (101). Cuando el hongo se lesiona o es atacado por insectos o caracoles, el estearoílvolutinal se convierte rápidamente, posiblemente por procesos enzimáticos, en los dos dialdehídos sesquiterpénicos **tóxicos**: **(+)-isovelleral** con esqueleto de marasmano, y **velleral** (Fig. 8) con esqueleto de lactarano. Estos dos compuestos tóxicos son luego reducidos gradualmente mediante el carpóforo a compuestos menos tóxicos como **isovellerol** y **vellerol** (Fig. 8) y, eventualmente, a **vellerdiol** (diol de velleral) (Fig. 8) (101). Estos compuestos constituyen el sistema de defensa química que se mencionara.





**Figura 8:** Estructuras químicas de esteroilvelutinal, velutinal, (+)-isovelleral, velleral, isovellerol, vellerol y vellerdiol.

La toxicidad de isovelleral y de velleral es similar y más de 10 veces mayor que la de esteroilvelutinal, isovellerol, vellerol y vellerdiol. La marcada disminución de la toxicidad de isovelleral y velleral por reducción química del grupo aldehído de C-13 indica la importancia de este último para la actividad biológica.

El hecho que los sesquiterpenos, no ésteres, se formen cuando el hongo se lesiona y, su posterior reducción enzimática a otros compuestos mucho menos tóxicos, tendría el efecto de evitar que el hongo entre en contacto y sea atacado por estos compuestos antifúngicos de defensa.

Velleral e isovelleral ya se había aislado de carpóforos de *Lactarius torminosus*, cuyo sabor acre y picante, así como la toxicidad de los carpóforos se debe a la formación de estos dialdehídos insaturados. Velleral e isovelleral mostraron actividad antimicrobiana y antifúngica, isovellerol y vellerol mostraron actividad parcial y, esteroilvelutinal y vellerdiol, ninguna actividad (102).

Isovelleral también resultó ser un potente mutágeno de acción directa en el test de Ames, así como un antifeedant para insectos y un potente antifeedant para topes. Isovellero también resultó ser mutagénico, pero unas diez veces menos que isovelleral.

Los derivados de lactarano, marasmano y/o *seco*-lactarano como (+)-isovelleral, velleral, isovellerol y vellerol no son exclusivos de *L. vellereus*, sino que se encuentran en muchas especies de *Lactarius* y *Russula*; como ejemplo, especies tóxicas (pungentes) del género *Lactarius*: *L. aurantiacus*, *L. chrysorrheus*, *L. helvus*, *L. necator*, *L. rufus*, *L. scrobiculatus*, *L. subdulcis*, *L. trivialis*, *L. turpis*, *L. utilis* y *L. volemus* (103, 104). *L. necator*, *L. rufus* y *L. trivialis* contienen esteroilvelutinal y 6-cetoesteroilvelutinal (105). *L. trivialis* también contiene lactarorrufina A, blenina C y el furanolactarano furandiol (105).

Cada especie parece exhibir su propio patrón característico, con los siguientes parámetros variables: a) los ácidos grasos en los ésteres de velutinal; b) la cantidad de velutinal originalmente presente en el hongo; c) la cantidad relativa formada de isovelleral y velleral; d) la tasa de conversiones enzimáticas; e) la formación de otros sesquiterpenos, supuestamente derivados de isovelleral y velleral.

*Russula queletii*, no comestible, por ejemplo, que contiene menos éster de velutinal que *L. vellereus*, produce velleral y vellerol, pero no isovelleral e isovellerol, y además, también produce otros sesquiterpenos.

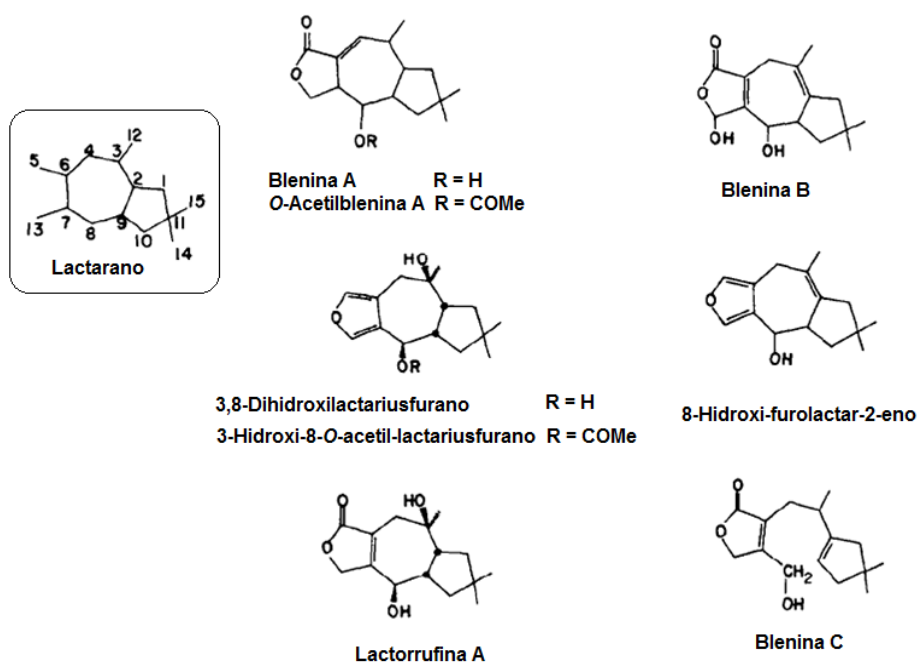
Los micólogos clasifican a los hongos según su pungencia y como isovelleral y velleral tienen un sabor muy pungente, se debería esperar que las especies pungentes de Russulaceae produjeran isovelleral y/o velleral, a diferencia de las no pungentes. A veces el primer sabor

confunde, como ocurre con *Lactarius quietus* que se describe como de sabor suave o ligeramente amargo, pero si se mantiene en la boca durante al menos un minuto, aparece un sabor fuerte debido a la presencia de isovelleral, acompañado por isovellerol; *L. quietus* no produce vellerol ni vellerol.

Del extracto etanólico de los carpóforos de *Lactarius blennius*, que es un hongo no comestible que crece en los bosques de hayas en los Apeninos italianos, se aislaron varios sesquiterpenos, entre ellos las lactonas **blenina A** y su derivado **8-O-acetilado, blenina B**, los furosesquiterpenos **3,8-dihidroxi-lactariusfurano** o **3,8-dihidroxi-furo-lactarano** (o furandiol), **3-hidroxi-8-O-acetil-lactariusfurano**, **8-hidroxi-furo-lactar-2-eno**, y las lactonas sesquiterpénicas **lactarorrufina A** y **blenina C** (Fig. 9) (105).

Varios de ellos se han encontrado previamente en diferentes especies de hongos, así por ejemplo, 3,8-dihidroxi-furo-lactarano y derivado su 8-O-acetilado, 3-hidroxi-8-acetoxilactarius-furano o 3-hidroxi-8-acetoxifuro-lactarano se encuentran también en *L. scrobiculatus* y *L. necator*; blenina C se aisló de *L. blennius* y de *L. scrobiculatus*; lactarorrufina A, furandiol y metoxi-furanolcohol se aislaron de *Russula sardonica* (10) y de *R. emetica* (106).

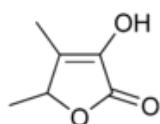
Todos estos compuestos tienen el **esqueleto de lactarano** inusual y característico que parece exclusivo de los sesquiterpenos de las especies tóxicas y no comestibles de los géneros *Lactarius* y *Russula*.



**Figura 9:** Estructuras químicas de blenina A y su derivado 8-O-acetilado, blenina B, 3,8-dihidroxi-lactariusfurano (o furandiol), 3-hidroxi-8-O-acetil-lactariusfurano, 8-hidroxi-furo-lactar-2-eno, lactarorrufina A y blenina C.

**Otros compuestos presentes en los carpóforos:** En *Lactarius helvus* el compuesto que da lugar al aroma y olor distintivo de esta especie es **sotolón** (4,5-dimetil-3-hidroxi-2,5-dihidrofuran-2-ona) (Fig. 10) (107), que da también el olor característico a las semillas de hinojo, al apio de monte, al sake añejado y al tabaco tostado. Recientemente, se realizó una actualización sobre los compuestos volátiles de hongos (108).





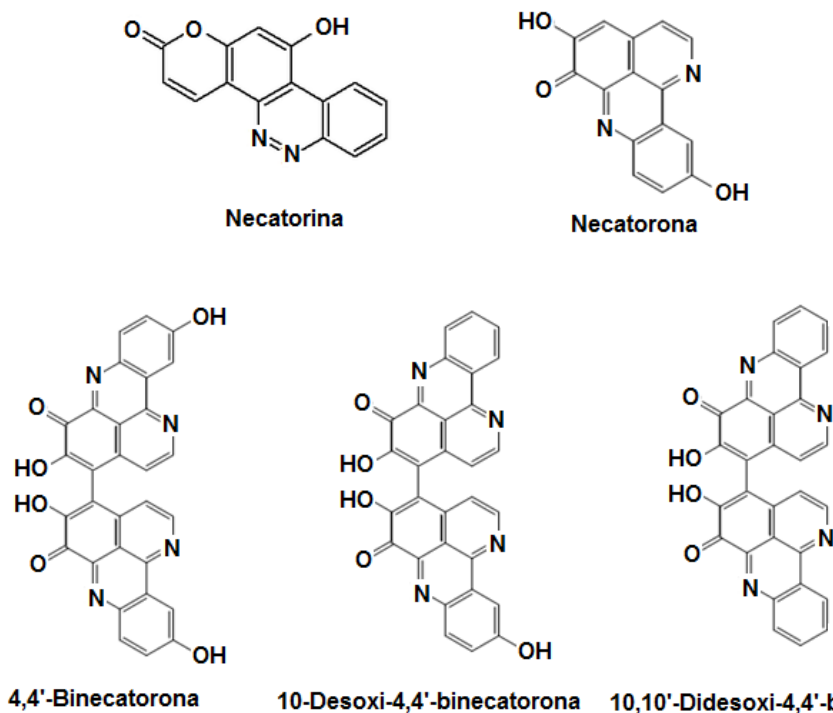
**Sotolón**

**Figura 10:** Estructura química de sotolón.

Los carpóforos de *L. trivialis* y *L. rufus* contienen **muscarina** en unos 2 mg/kg de peso fresco, correspondiendo a **L-(+)-muscarina** (~ 40%) y **sus estereoisómeros** (~60%). Estas cantidades bajas no son de preocupación toxicológica para los niveles normales de consumo de estos hongos (64).

Los carpóforos frescos de *L. turpis* y *L. necator* contienen el compuesto mutagénico **necatorina** (Fig. 11), a concentraciones de 3 a 20 mg/kg, por lo que no se recomienda comerlos. La ebullición reduce la concentración de este compuesto, pero no lo elimina de manera efectiva (109, 110). Necatorina se aisló como cristales rojos brillantes y demostró ser muy mutagénica en el test de Ames en tres cepas de *Salmonella*.

La ebullición/escaldado destruye aproximadamente la mitad de la necatorina en el hongo dejando alrededor del 25% del contenido original en el hongo y ~25% en el agua (109, 110). La destrucción de necatorina pura por ebullición fue más efectiva a pH ácido (pH = 5,0).



**Figura 11:** Estructuras químicas de necatorina, necatorona, 4,4'-binecatorona, 10-desoxi-4,4'-binecatorona y 10,10'-didesoxi-4,4'-binecatorona.

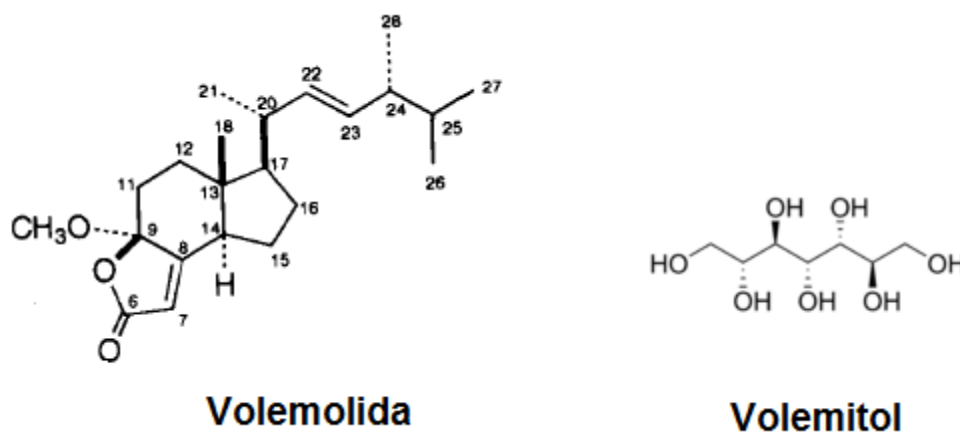
El compuesto mutagénico **necatorona** (5,10-dihidroxi-6*H*-pirido[4,3,2-*k*]acridin-6-ona) (Fig. 11) es un pigmento alcaloidal aislado de los carpóforos de *Lactarius turpis* o *L. necator* y *Lactarius atroviridis* (109, 110), junto con dímeros de este alcaloide, como **4,4'-binecatorona** (sólido cristalino pardo rojizo), **10-desoxi-4,4'-binecatorona** (sólido cristalino pardo rojizo) y **10,10'-didesoxi-4,4'-binecatorona** (sólido cristalino anaranjado) (Fig. 11), que también son mutagénicos (111).

Varias especies de *Lactarius* presentaron un **poliisopreno** correspondiente a un contenido de **caucho líquido** de 0,1% a 7% en peso seco (112). Se encontró que el caucho de *L. volemus*, *L. chrysorrhoeus* y *L. hygrophoroides* es un homólogo del poliprenol que está compuesto de un

grupo dimetilalilo, dos unidades de *trans*-isopreno, 160-300 unidades de *cis*-isopreno y un grupo terminal hidroxilo o éster (112, 113). El número de grupos terminales y de unidades *trans* disminuye durante el envejecimiento de los esporóforos. El caucho de *L. piperatus*, *L. vellereus* y *L. subpiperatus* es *cis*-poliisopreno, con cantidades muy pequeñas de grupos terminales y unidades *trans* (112, 113). Dada la gran cantidad de caucho natural que poseen se considera que los carpóforos de *L. volemus* pueden usarse para producir caucho. Es probable que el alto contenido de *cis*-poliisopreno pueda influir negativamente en la digestibilidad de este hongo.

*Lactarius rufus* contiene una **lectina** con seis subunidades idénticas, siendo cada subunidad de ~17 kDa; el 85% de su actividad se pierde calentando el hongo a 65°C (114). Algunas lectinas en alimentos se sabe que causan malestar gastrointestinal, especialmente si la comida no fue suficientemente tratada térmicamente.

Antes del consumo, estos hongos requieren ser pre-tratados (salado/tratamiento con calor) para destruir las sustancias acres y se debe descartar el agua del pretratamiento.



**Figura 12:** Estructuras químicas de volemida y volemitol.

Los carpóforos de *L. volemus* contienen un compuesto con un esqueleto de hepta-*nor* ergostano llamada **volemolida** (Fig. 12), derivado del ergosterol, que es el esteroil común en hongos, que puede tener aplicación en la quimiotaxonomía fúngica (115) y **volemitol** (*D*-glicero-*D*-manoheptitol) (Fig. 12), un glicitol de siete carbonos, que se encuentra libre en muchas especies de plantas y de algas pardas (116). También se identificaron siete esteroides tipo ergostano, muy oxigenados, similares a los esteroides del coral blando marino y las esponjas marinas, que son raros en los hongos (117).

Las especies comestibles *Lactarius deliciosus* y *L. deterrimus* contienen además de los **sesquiterpenos con esqueleto de azuleno**, **compuestos indólicos** y **lectinas**. Así, se aislaron e identificaron **5-hidroxitriptofano**, **serotonina** y **melatonina**, así como **sulfato de kinurenina**, que es un metabolito de triptofano, de los carpóforos de *L. deliciosus* (118); se demostró que por ebullición de este hongo 5-hidroxitriptofano y serotonina se destruyeron completamente, mientras que se formaron **triptofano**, **5-metiltriptofano** y **triptamina**. De manera similar, **triptofano**, **triptamina** y **melatonina** se aislaron de *L. deterrimus* (119). Algunos de estos compuestos pueden actuar como hormonas tisulares y neurotransmisores y altas ingestas pueden dañar al sistema nervioso (120).

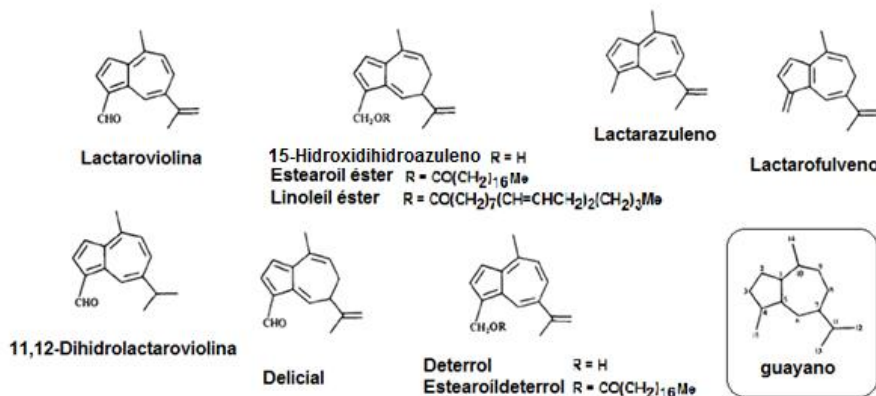
*L. deliciosus* posee una **lectina dimérica** de ~37 kDa (subunidades de ~19 y 18 kDa) (121), mientras que la lectina de *L. deterrimus* es de ~31 kDa con dos subunidades idénticas (122).

**Mecanismo de acción de las toxinas:** Los sesquiterpenos descriptos actúan como irritantes en el tracto gastrointestinal de los pacientes. Se necesita ahondar más sobre la manera en que actúan.

**Diferencias químicas entre hongos comestibles y tóxicos del género *Lactarius*:** Se encontró que los carpóforos intactos de los hongos comestibles, *Lactarius deliciosus* y *L. deterrimus*, contienen sólo un sesquiterpeno en forma de dos ésteres de ácidos grasos: **15-O-estearoíloxi-**

**dihidroazuleno** (componente principal) y **15-*O*-linoleíloxi-dihidroazuleno** (componente minoritario) (Fig. 13) (123). Al igual que en las especies tóxicas (pungentes) de *Lactarius*, si bien menos rápidamente, estos ésteres originales se convierten, enzimáticamente, en otros compuestos cuando se lesionan (se cortan) los carpóforos. No se detectaron diferencias, ni cualitativas ni cuantitativas, entre *L. deliciosus* y *L. deterrimus* en este aspecto. Las conversiones de los sesquiterpenos pueden ser parte de un sistema de defensa química, como se ha mencionado para otras especies (123).

**Lactaroviolina**, **15-hidroxidihidroazuleno**, su éster **15-estearoiloxidihidroazuleno**, **lactarazuleno** y **deterrol** (Fig. 13) han sido aislados de especímenes europeos de *L. deliciosus*. En cambio, **lactarofulveno** se aisló de especímenes californianos de *L. deliciosus* (123), mientras que **11,12-dihidrolactaroviolina** (Fig. 13) se aisló de *L. deterrimus* de la India (124). Una explicación de esta aparente diferencia entre especímenes de diferentes continentes puede ser la existencia de subespecies de *L. deliciosus* y *L. deterrimus*.



**Figura 13:** Estructuras químicas de lactaroviolina, 15-hidroxidihidroazuleno, 15-*O*-estearoiloxi-dihidroazuleno, 15-*O*-linoleíloxi-dihidroazuleno, lactarazuleno, lactarofulveno, 11,12-dihidrolactaroviolina, delicial, deterrol y estearoil deterrol.

El éster de ácido esteárico de deterrol (**estearoil deterrol**) (Fig. 13) se aisló previamente de carpóforos de *Lactarius indigo*. Este éster parece ser el principal sesquiterpenoide presente originalmente en los carpóforos de esta especie y es responsable del color azul profundo de su látex.

La inestabilidad de los derivados de azuleno, como el **alcohol 15-hidroxidihidroazuleno** y **delicial**, favoreció la formación de pequeñas cantidades de otros compuestos, que no están originalmente en los carpóforos, durante el manejo y el almacenamiento de los extractos. Uno de esos compuestos resultó ser un dímero de dos sesquiterpenos guayanos. En cambio, **lactaroviolina** y **deterrol**, presentaron cierta estabilidad; se forman lentamente y se acumulan en el tejido de los hongos durante las primeras horas después de la lesión (123).

*Lactarius deliciosus* (Fr.) Gray es una especie micorrízica comestible que crece bajo pinos; en particular en Argentina este hongo está asociado a plantaciones de *Pinus elliotii* introducidas en nuestro país en el nordeste argentino (provincia de Misiones) (125).

El látex de los carpóforos de *Lactarius deliciosus* y *L. deterrimus* es primero de color anaranjado, pero lentamente (en minutos) se oscurece y finalmente se vuelve verde; esta característica hace que muchos dejen de lado estas exquisitas especies. Estos colores en *L. deliciosus* y *L. deterrimus* se demostró que se deben a los sesquiterpenos del tipo guayano que se han visto, que por tener dobles enlaces conjugados dan colores intensos en la zona visible. El color verde que el látex asume con el tiempo se debe a la formación de compuestos color violeta y azul (lactaroviolina y deterrol) y su mezcla con los compuestos amarillos (15-hidroxi-dihidroazuleno, 15-estearoiloxidihidroazuleno, 15-linoleíloxi-dihidroazuleno y delicial) ya presentes o también formados (123).

Los sesquiterpenos de las especies *L. deliciosus* y *L. deterrimus* tienen únicamente esqueleto de guayano, que no se encuentra en las especies tóxicas (pungentes) de *Lactarius*.

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Russulales*; Familia: *Russulaceae*; ***Lactarius alnicola*** A.H. Sm. crece en micorrizas con coníferas y especies de hoja caduca como roble y aliso, en los bosques nativos del oeste de Estados Unidos, Méjico (Baja California), India y en las plantaciones patagónicas de *Pinus ponderosa* y abeto de Douglas (especies del género *Pseudotsuga*) en Argentina (126); ***Lactarius torminosus*** (Schaeff.) Gray [Bas.: *Agaricus torminosus* Schaeff.; sin.: *Galorrheus torminosus* (Schaeff.) P. Kumm.; *L. torminosus* f. *torminosus* (Schaeff.) Gray; *L. torminosus* var. *sublateritius* Kühner & Romagn.; *Lactifluus torminosus* (Schaeff.) Kuntze] crece en Europa formando micorrizas con abedules; ***Lactarius helvus*** (Fr.) Fr. [Bas.: *Agaricus helvus* Fr.; sin.: *Galorrheus helvus* (Fr.) P. Kumm., *Lactifluus helvus* (Fr.) Kuntze]; ***Lactarius rufus*** (Scop.) Fr. [Bas.: *Agaricus rufus* Scop.] crece en zonas templadas de Europa, incluyendo zonas subárticas/subalpinas de los países escandinavos, y en América del Norte (norte de California) forma micorrizas con pinos, abedules o abetos (103); ***Lactarius trivialis*** (Fr.) Fr. [Bas.: *Agaricus trivialis* Fr.] se encuentra en América del Norte (EE. UU., Canadá, México) y Europa (Gran Bretaña e Irlanda, países escandinavos, algunas regiones de Alemania, Prusia Oriental y en Rusia blanca y noroccidental, pero se vuelve mucho más raro en el sur y suroeste de Europa); ***Lactarius turpis*** Fr. [Sin.: *Agaricus turpis* Weinm., *Galorrheus turpis* (Weinm.) P. Kumm., *Lactifluus turpis* (Weinm.) Kuntze] crece en Europa y Siberia, y se ha introducido en Australia y Nueva Zelanda. Por lo general, pero no siempre, por un problema de nomenclatura, se consideran sinónimos de la misma especie: ***Lactarius turpis*** Fr., ***L. necator*** (Bull.: Fr.) Karsten y ***L. plumbeus*** (Bull.: Fr.) S. F. Gray; en Europa occidental se clasifica este hongo como no comestible; pero en países escandinavos, Siberia y el este de Europa se consumen después de hervirlos y se conservan en sal; ***Lactarius necator*** (Bull.) Pers. [= *L. necator* (Bull.: Fr.) Karsten] no es comestible, forma micorrizas con píceas (*Picea*) y abedules (*Betula*) en zonas templadas-hemiboreales en los países nórdicos, excepto en Islandia, donde es muy raro (103); ***Lactarius utilis*** (Weinm.) Fr. [Bas.: *Agaricus utilis* Weinm.; sin.: *Lactifluus utilis* (Weinm.) Kuntze] está muy relacionado con *L. trivialis* (hay diferencias en el píleo y en el látex) y se distribuye en la zona boreal del norte de Europa y forma micorrizas con píceas o abedules; ***Lactarius vellereus*** (Fr.) Fr. [Bas.: *Agaricus vellereus* Fr.; sin.: *Agaricus vellereus* var. *vellereus* Fr., *Galorrheus vellereus* (Fr.) P. Kumm., *Lactarius albivellus* Romagn., *L. vellereus* var. *vellereus* (Fr.) Fr., *L. vellereus* var. *velutinus* (Bertill.) Bataille, *L. velutinus* Bertill., *Lactifluus vellereus* (Fr.) Kuntze]; ***Lactarius volemus*** (Fr.) Kuntze [Bas.: *Agaricus volemus* Fr.; sin.: *L. volemus* (Fr.) Fr., *Agaricus lactifluus* L., *Agaricus oedematopus* Scop., *L. oedematopus* (Scop.) Fr., *Galorrheus volemus* (Fr.) P. Kumm., *Lactarius lactifluus* (L.) Quél., *Lactifluus oedematopus* (Scop.) Kuntze, *L. wangii* H.A. Wen & J.Z. Ying] se considera un hongo comestible si bien contiene *cis*-poliisoprenos; forma micorrizas en bosques caducifolios y coníferas; ***Russula emetica*** (Schaeff.) Pers. [Bas.: *Agaricus emeticus* Schaeff.; sin.: *A. russula* Scop., *A. ruber* (Lam.) DC., *A. linnaei* var. *emeticus* (Schaeff.) Fr., *Amanita rubra* Lam., *Russula rubra* (Lam.) Fr., *Melanoleuca russula* (Scop.) Murrill]; ***Russula queletii*** Fr.; ***Russula sardonis*** Fr.

#### 2.1.7. Vinilglicina en *Entoloma sinuatum* y otras especies de *Entoloma*:

Esta intoxicación es provocada por varios miembros del gran género *Entoloma*, que contiene alrededor de 1500 especies. Muchas especies de *Entoloma* son tóxicas, como *E. sinuatum* (9) en Europa y *E. rhodopolium* (127-129) en Japón, si bien algunas otras son comestibles, como *Entoloma abortivum* y *E. sarcopum*.

*Entoloma sinuatum* posee el mayor número de registros de intoxicaciones por su consumo en Europa y América del Norte (30, 130, 131). Algunas guías sobre hongos se refieren a esta especie por sus nombres científicos más antiguos de *Entoloma lividum* o *Rhodophyllus sinuatus*. También producen este tipo de micetismo: *Entoloma nidorosum* y *E. vernum*.

*Entoloma rhodopolium* es un hongo tóxico, pero no letal, de Europa y Asia. Es uno de los tres hongos más comúnmente implicados en intoxicaciones en Japón (132). Su carne es clara y endeble, con olor muy desagradable parecido al del amoníaco o la lejía. Los estudios filogenéticos moleculares, realizados en 2017, han mostrado que los clados -I, -II y -III de *E. rhodopolium* japoneses son distintos de los de *E. rhodopolium* europeo, *E. aff.*



*rhodopolium* de América del Norte, *E. nidorosum* y otras especies conocidas de *Entoloma* (133). El resultado indica que los clados japoneses de *E. rhodopolium* son especies nuevas, que denominaron *E. lacus*, *E. subrhodopolium* and *E. pseudorhodopolium* respectivamente. Esto indica que hay una diversidad morfológica dentro de una especie (133).

**Período de latencia:** Los síntomas aparecen 30 minutos a 2 horas después del consumo y duran hasta 48 horas. En cambio, en el caso *E. sinuatum*, el período de latencia es algo más largo, ya que los síntomas aparecen después de unas 4 horas.

**Sintomatología:** *E. sinuatum* es muy tóxico; causa intoxicación con náuseas, vómitos, gastroenteritis y hepatopatía leve, dolor de cabeza y diarrea severa que puede conducir a la deshidratación, un conjunto de síntomas denominado "síndrome resinoideo severo", así como enrojecimientos en algunos lugares del cuerpo.

La pérdida importante de líquidos va generalmente acompañada por pérdida de electrolitos (magnesio, potasio, calcio), que causa calambres musculares y, a veces, trastornos circulatorios potencialmente mortales. Además, la suposición de una amenaza de vida a menudo conduce a la ansiedad con sudoración y sensación de frío. Generalmente se resuelven después de 1 a 2 días, sin secuelas (75).

En resumen, los trastornos gastrointestinales pueden ser graves, en ciertos casos mortales, a veces con un daño leve parenquimatoso hepático. También puede producirse toxicidad hepática aguda y síntomas psiquiátricos, como alteración del estado de ánimo o delirio. El delirio y la depresión son secuelas poco comunes. En raras ocasiones, los síntomas de depresión pueden durar meses (10).

La intoxicación generalmente pasa después de 5 a 6 días. Sin embargo, puede ser fatal en personas debilitadas, en adultos mayores y niños.

En cambio, *Entoloma nidorosum* es una especie tóxica, cuyo olor muy desagradable desalienta su consumo y por lo tanto limita el número de pacientes intoxicados. Además, la intoxicación debida a la ingestión de *E. nidorosum* es más leve que la provocada por *E. sinuatum*, sólo causa náuseas, vómitos y diarreas, con una evolución sin casos fatales; la recuperación se produce en unas 12 horas.

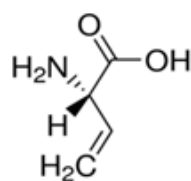
La intoxicación por ingestión de *E. vernum* presenta como síntomas dolores abdominales con diarrea profusa, no hay casos fatales y los pacientes se recuperan, sin secuelas.

Los síntomas provocados por *E. rhodopolium* son predominantemente de naturaleza gastrointestinal (diarrea, vómitos, dolor gástrico, dolor de cabeza), pero se han descrito también signos de tetania (134), pérdida de equilibrio y astenia (135) y sudores fríos. Si bien *E. rhodopolium* contiene muscarina, muscaridina y colina, deben estar en cantidades pequeñas pues no se observaron síntomas de síndrome muscarínico.

**Casos de intoxicación:** *Entoloma sinuatum* ha sido citado como responsable del 10% de todos los micetismos en Europa (136). Así, por ejemplo, 70 personas necesitaron tratamiento hospitalario sólo en Ginebra en 1983 (130), y el hongo representó 33 de 145 casos de micetismos en un período de cinco años en un solo hospital en Parma (131).

En 1974 se describió la intoxicación de una pareja debida a ingestión de *Entoloma vernum*, que tuvo que ser internada (137). De 24 intoxicaciones debidas a la ingestión de *E. rhodopolium* y/o *E. nidorosum*, 21 pacientes sufrieron una intoxicación colectiva por *E. rhodopolium* (134). Posteriormente se registró una intoxicación colectiva de 23 personas en Japón (135), otros 5 casos y dos intoxicaciones en Francia en 1982. *E. rhodopolium* es una de las tres principales especies responsables de los 2.096 incidentes de micetismos que involucraron a 10.924 pacientes de 1959 a 1988 en Japón (138), que correspondieron a tasas respectivas de pacientes totales y muertes de 90,3% y 10,7% para intoxicaciones con síntomas tipo cólera, así como 90,2% y 0,2% para los de irritación gastrointestinal (138).

**Toxinas:** Se considera que la toxina es **vinilglicina** (ácido 2-amino-3-butenoico) (Fig. 14); se aisló de *Entoloma nidorosum* (10) y de *E. lividoalbum* (139); se han registrado casos de intoxicación (132). Si bien este aminoácido con propiedades tóxicas ha sido aislado, nada prueba que sea el único responsable de los trastornos.

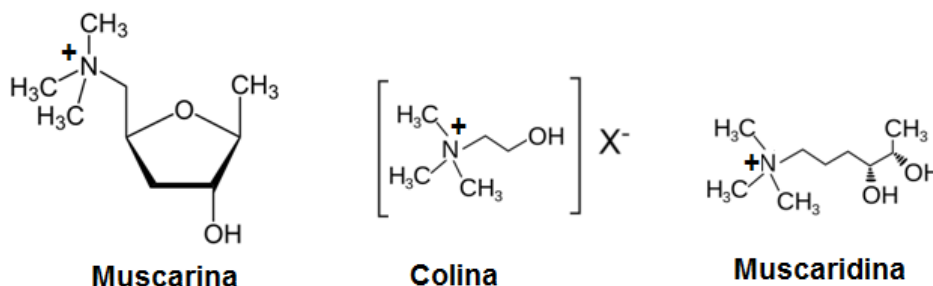


**Vinilglicina**

**Figura 14:** Estructura química de vinilglicina.

Se han encontrado alcaloides en los carpóforos de *E. sinuatum* (140).

Un estudio de **oligoelementos** en hongos de la región oriental del Mar Negro de Turquía encontró que *E. sinuatum* tiene los niveles más altos de **cobre** ( $64,8 \pm 5,9 \mu\text{g/g}$  de carpóforos secos; insuficiente para ser tóxico) y **cinc** ( $198 \mu\text{g/g}$ ) registrados (141). Los sombreros y los tallos ensayados en un área con altos niveles de **mercurio** en el sudeste de Polonia demostraron que bioacumulaba niveles mucho más altos de mercurio que otros hongos. El elemento también se encontró en niveles altos en el sustrato rico en humus (142). *Entoloma sinuatum* también acumula compuestos que contienen **arsénico**. De  $\sim 40 \mu\text{g}$  de arsénico presentes por gramo de tejido fresco de hongo,  $\sim 8\%$  era **arsenito** y el otro  $92\%$  era **arseniato** (143). Además, el hongo contiene **lectinas**, que específicamente producen la aglutinación de los hematíes del grupo sanguíneo A. También actúa como insecticida para las moscas de la fruta.



**Figura 15:** Estructuras químicas demuscarina, colina y muscaridina.

En 1985 se aislaron **colina**, **muscarina** y **muscaridina** (Fig. 15) de extractos alcohólicos del carpóforo de *E. rhodopolium* (144). En 1987, se demostró que una fracción de un extracto acuoso responsable de hemorragia intestinal, diarrea y muerte en ratones, tenía propiedades hemolíticas (127), luego de ser purificada en 1988 y 1990 resultó ser una **hemolisina** de 40 kDa, relativamente termolábil (128, 129), cuyo rol en la intoxicación humana sigue siendo desconocido. **La actividad hemolítica de la hemolisina purificada se destruyó por calentamiento a  $60^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y se redujo parcialmente por pepsina, papaína y 2-mercaptoetanol. La hemolisina fue inestable por debajo de pH 7,0, pero estable a pH 8,0. El pH óptimo para la hemólisis fue 6,0. La hemólisis no se produjo por debajo de  $4^\circ\text{C}$  a pesar de que la hemolisina se unió al eritrocito. Los eritrocitos de ratón, pollo, rata, caballo y humanos fueron sensibles en este orden, pero los eritrocitos de oveja y vaca no fueron lisados por la toxina (129).**

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Entolomataceae*; especies del género *Entoloma* (53). *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm. [Bas.: *Agaricus lividus* Bull.; Sin.: *Agaricus sinuatus* Pers., *Entoloma sinuatum* (Pers.) P. Kumm., *E. eulividum* Noordel., *E. lividum* (Bull.) Quéél., *Rhodophyllus lividus* (Bull.) Quéél., *R. sinuatus* Singer, *R. sinuatus* (Bull.) Quéél.] forma micorrizas con árboles de hoja caducaprin cipalmente haya, roble y, con menor frecuencia, abedul, en suelos arcillosos o calcáreos o en parques cercanos, a veces en forma de anillos de hadas, en Europa (desde Francia en el oeste hasta Estonia y Bielorrusia en el este, Alemania en el centro y sur hasta España, Italia, Bulgaria y Rumania y al norte Dinamarca

y el sur de Noruega), América del Norte (Canadá, EE. UU.) y Asia (Turquía, Asia Menor, China y Japón); saprotrofos, si bien esta especie forma una relación ectomicorrízica con el sauce (*Salix*) (145). ***Entoloma nidorosum*** (Fr.) Quél. [Bas.: *Agaricus nidorosus* Fr.; sin.: *Rhodophyllus nidorosus* (Fr.) Quél., *Entoloma rhodopolium* f. *nidorosum* (Fr.) Noordel., *E. rhodopolium* var. *nidorosum* (Fr.) Krieglst.]; ***Entoloma niphoides*** Noordel.; ***Entoloma rhodopolium*** (Fr.) P. Kumm. [Bas.: *Agaricus rhodopolius* Fr.; sin.: *Entoloma nidorosum* (Fr.) Quél., variedades de *E. nidorosum*, variedades de *E. rhodopolium*, *Agaricus nidorosus* Fr., variedades de *A. rhodopolius* Fr., *Rhodophyllus nidorosus* (Fr.) Quél., *R. rhodopolius* (Fr.) Quél., variedades de *R. rhodopolius*] se encuentra en bosques de frondosas (raramente aparece bajo coníferas) en Europa y Asia (Japón); ***Entoloma vernum*** Lundell [Sin.: *Rhodophyllus cucullatus* J. Favre, *Nolanea cucullata* (J. Favre) P. D. Orton, *Nolanea verna* (S. Lundell) Kotl. & Pouzar] (146).

#### 2.1.8. Toxina hemolítica rubescenslisina en el hongo comestible *Amanita rubescens*:

*Amanita rubescens* es una especie muy común en toda Europa y expandida a los otros continentes, si bien se cree que la encontrada en EE. UU. es diferente a la europea.

Se presenta en diferentes variantes de color de sombrero (rojizo, marrón y plata metálica brillante) y también puede asumir diferentes apariencias, por ejemplo, hay una variante blanca pura. También varía el tamaño del sombrero; se han encontrado ejemplares de *A. rubescens* completamente maduros con sombreros de no más de 2,5 cm de diámetro, mientras que otros alcanzan casi diez veces ese tamaño. Tanto su nombre científico como los comunes derivan de la propensión de su carne a volverse rosada al cortarla o golpearla (103).

*Amanita rubescens* se considera comestible si está bien cocida; pero, dado que se sabe que contiene una toxina hemolítica en estado crudo que causa anemia y que, aún con un shock térmico para destruirla, los hongos resultan indigestos, la mayoría de las personas optan por no consumirlos. Además, debe cuidarse su identificación porque se presta a confusión con *Amanita pantherina*, que es muy tóxica.

**Toxinas:** La toxina es **rubescenslisina**, que es una proteína hemolítica, rompe la membrana citoplásmica de los leucocitos y de los eritrocitos humanos (103). En todos los tejidos investigados, los efectos de rubescenslisina comenzaron en unos pocos minutos, fueron dependientes de la dosis y prácticamente irreversibles (147).

Se detectaron pequeñas diferencias en la sensibilidad entre varios órganos y especies. Las observaciones indican que la toxina es relativamente inespecífica en su ataque a los componentes de las membranas celulares.

**Ensayos en animales y en órgano aislado:** En los corazones aislados de ratas y cobayos causó una contractura sistólica, que fue precedida por un flujo de salida de potasio y, a veces, por un efecto inotrópico positivo transitorio. En la aurícula izquierda (atrio izquierdo) de cobayo estimulada eléctricamente mostró al principio un efecto positivo, seguido de un efecto inotrópico negativo; en la aurícula derecha, que latía espontáneamente, produjo un efecto transitorio positivo seguido de efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos. Los atrios fueron menos sensibles que los corazones intactos. En la preparación aislada de nervio frénico-diafragma de rata produjo una contractura, que se asoció con la reducción de la contractilidad indirecta y directa. En el íleon aislado de cobayo produjo una contracción lenta seguida de taquifilaxis. Como la excitabilidad disminuyó debido a rubescenslisina, también lo hizo la excitabilidad por acetilcolina y potasio. La atropina y la feniramina tuvieron sólo efectos antagonistas débiles, pero la papaverina fue más poderosa.

En los hepatocitos de rata aislados, la rubescenslisina provocó una salida rápida de potasio y protusiones de células gruesas, mientras que más tarde las células se volvieron teñibles con azul tripán. En el hígado de rata aislado y perfundido produjo una salida rápida de potasio y de enzimas citoplasmáticas y mitocondriales, y un flujo de salida más lento de  $\beta$ -glucuronidasa lisosómica, acompañado de un aumento en la relación lactato/piruvato y una disminución en la producción de bilis. En el riñón de rata perfundido aislado causó una salida de enzimas citoplásmicas y mitocondriales, junto con proteinuria masiva y una restricción grave de la reabsorción de sodio y potasio y de la producción de orina (147).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Amanitaceae*; ***Amanita rubescens*** (Pers.: Fr.) Gray [Bas.: *Amanita rubescens* Pers.; sin.: *Agaricus rubescens* (Pers.) Fr., *Agaricus rubescens* var. *rubescens* (Pers.) Fr., *Amanita rubescens* var. *rubescens* Pers., *Amanita rubescens* var. *alba* Coker, *Amplariella rubescens* (Pers.) E.-J. Gilbert, *Limacium rubescens* (Pers.) J. Schröt.] forma micorrizas con madera dura y árboles de madera blanda, crece en pinares y en brezales; en muchos bosques de coníferas en suelos ácidos pobres, donde se encuentran en pequeños grupos, más que individualmente. Se encuentra en Europa (desde el Reino Unido y Francia en el oeste, pasando por toda Alemania, hasta Bielorrusia y Rusia en el este, y desde Islandia y Fenoscandia en el norte hasta España, Italia y Bulgaria en el sur; también en las Islas Canarias), en África (Marruecos y Argelia, Sudáfrica), y en Asia (Israel, Asia Menor, Siberia, Corea y Japón), en América del Norte y Central (103).

#### **2.1.9. Proteína tóxica en *Chlorophyllum molybdites*:**

*Chlorophyllum molybdites* es el hongo que causa la mayor cantidad de intoxicaciones anualmente en la ciudad de Buenos Aires y alrededores (Argentina) (148,149) y también en ciudades de América del Norte (150). Se considera que la causa de las intoxicaciones en ciudades se debe a su gran tamaño y a su hábito de crecer en áreas cercanas a zonas pobladas. Además, puede confundirse con *Macrolepiota bonaerensis* Speg. y con el hongo parasol comestible *Macrolepiota procera*. Es un hongo imponente con un sombrero de hasta 40 cm de diámetro, de color blanquecino con escamas gruesas de color marrón. Las láminas son libres y blancas, usualmente volviéndose oscuras y verdes con madurez; esporada verde. El estípote puede tener hasta 25 cm de altura y lleva un anillo. *Chlorophyllum molybdites*, (“parasol falso”; en inglés: “false parasol”, “green-spored Lepiota” y “vomiter”) es un hongo muy tóxico que se lo suele confundir con las especies del complejo *Chlorophyllum* (“shaggy parasol”) que se encuentran en Europa, América del Norte y América del Sur, Australia y Sudáfrica, o con *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. (“shaggy mane”). El complejo *Chlorophyllum* comprende tres especies del género *Chlorophyllum* que están estrechamente relacionadas: *C. rachodes* (o *rhacodes*), *C. olivieri* y *C. brunneum*, que se encuentran en Europa, África meridional, EE.UU. y también en Argentina y Australia. Son hongos apreciados como comestibles de elección, pero contienen toxinas que pueden causar problemas gastrointestinales cuando se consumen crudos o poco cocidos y algunas personas presentan una fuerte respuesta alérgica incluso después de la cocción. Recientemente, se llevaron a cabo estudios taxonómicos en base a diferencias morfológicas y análisis filogenéticos moleculares de *Chlorophyllum*, reconociendo seis clados bien respaldados y 17 especies filogenéticas. Además, se propone una nueva clasificación infragenérica de *Chlorophyllum*, en la que el género se divide en seis secciones (151).

**Período de latencia:** Es muy corto, de 1 a-3 horas después del consumo (10).

**Sintomatología:** Los síntomas son predominantemente de naturaleza gastrointestinal, raramente fatales, pero graves (10, 152), con vómitos, diarrea y cólicos, heces con sangre, escalofríos, dolores intestinales, hemorragia gastrointestinal y, en algunos casos, convulsiones (153, 154). Se han detallado los síntomas ocasionados por esta especie en Argentina (148).

**Casos de intoxicaciones:** Si bien se considera que este hongo es un irritante gastrointestinal benigno, puede producir toxicidad severa y los pacientes pediátricos tienen una capacidad limitada para perder líquidos antes de volverse hipovolémicos. Se menciona a modo de ejemplo, el caso de una niña de 6 años que desarrolló un shock hipovolémico por intoxicación con *C. molybdites* (153). Se describieron dos casos de intoxicación por *Chlorophyllum molybdites* en adultos, con síntomas gastrointestinales graves, que requirieron hospitalización (154). Se revisaron la distribución geográfica de los casos, los signos y síntomas de la intoxicación y su tratamiento, los principios tóxicos, las esporas como alérgenos, poblaciones particularmente susceptibles y las variaciones en la respuesta asociada con cocinar estos hongos y con idiosincrasias individuales. Se indica además la aparición ocasional de hongos estériles que carecen de sus características basidiosporas verdes (154).



También se registró la intoxicación de un hombre sano de 43 años que ingirió tres hongos de *C. molybdites* en la isla francesa Reunión, situada en el océano Índico al este de Madagascar, y casi una hora y media después, presentó dolor abdominal intenso y diarrea sanguinolenta. El tratamiento sintomático y la reanimación con líquidos en la unidad de emergencia permitió que fuera dado de alta 48 horas después, sin secuelas (155). Recientemente, se registraron casos de intoxicación por *C. molybdites* en el estado de Kerala, India (156).

Antes de comer los carpóforos de *C. molybdites* se deben hervir y decantar el líquido antes de cocinarlos.

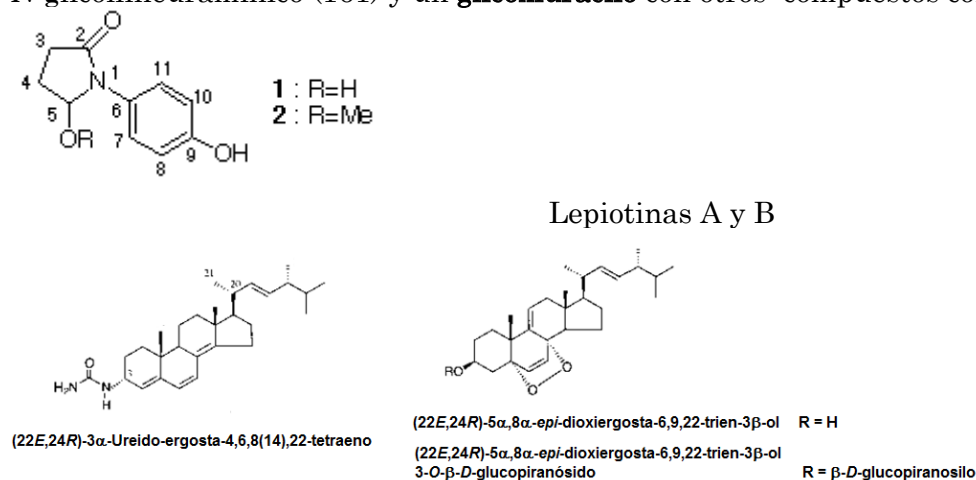
**Toxina:** En 1974 Eilers y Nelson demostraron que el componente tóxico de *C. molybdites* es de naturaleza proteica y realizaron la purificación parcial y caracterización de la **proteína tóxica**(157) de alto peso molecular, termolábil, que resultó tóxica al administrarla por vía intraperitoneal a animales de laboratorio (157); también se demostró que la toxina puede afectar no sólo a humanos sino también a perros y gallinas (157).

En el año 2012, Yamada *et al.* (158) aislaron una **proteína tóxica** de **23 kDa**, que denominaron **molibdofilisina**, de *C. molybdites* al seguir su efecto letal en ratones (158). Estos hallazgos parecen estar en contraposición con los de Eilers y Nelson, que informaron que el tóxico de este hongo es una proteína polimérica con una masa molecular superior a 400 kDa, compuesta de monómeros de 40-60 kDa (157). Molibdofilisina es una proteína relativamente pequeña; en consecuencia, puede corresponder al monómero informado por Eilers y Nelson.

El análisis de la secuencia de los fragmentos trípticos de molibdofilisina mostró que esta proteína es altamente homóloga a varias metaloendopeptidasas (MEPs), como GFMEP, POMEPE y AMMEPE. Estas proteínas contienen un motivo de unión al zinc conocido como aspzincina. Por lo tanto, la molibdofilisina es un miembro de la familia de las deuterolisinas de las proteasas de zinc (158).

Las metaloendopeptidasas se encuentran en muchos hongos y bacterias, pero las descritas hasta ahora no han presentado toxicidad. En este sentido, molibdofilisina es única y es de gran interés aclarar la relación entre su toxicidad y su actividad MEP. Con ese objetivo, se están realizando las determinaciones de la secuencia completa y la estructura tridimensional de molibdofilisina. Se encontró que la molibdofilisina tiene actividad proteolítica, que la retuvo a temperaturas de hasta 60°C con un pH óptimo de 7,0 (158).

También se aislaron de carpóforos de *C. molybdites* los alcaloides **lepiotina A** y **lepiotina B** (Fig. 16) (159), varios **esteroides de ergostano** con citotoxicidad contra las células Kato III (Fig. 16) (160), una **lectina de 32 kDa** con especificidad de unión más fuerte hacia el ácido *N*-glicolilneuramínico (161) y un **glicoxiuracilo** con otros compuestos conocidos (162).



**Figura 16:** Estructuras químicas de lepiotina A, lepiotina B, ergostanos libres y un glucopiranosido de ergostano.

Los extractos metanólicos de *C. molybdites* presentaron actividad antibacteriana contra

tres bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*) y dos bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y considerable actividad antifúngica contra seis patógenos fúngicos humanos (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor* sp., *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*) y contra un hongo patógeno no humano (*Candida maltosa*); también mostró fuertes efectos antioxidantes (163).

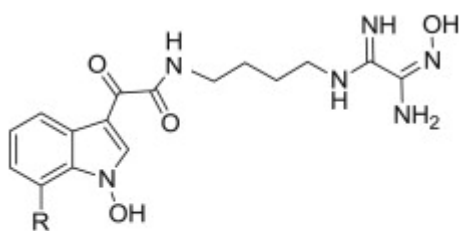
**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Subclase: *Homobasidiomycetidae*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Agaricaceae*; ***Chlorophyllum molybdites*** (G. Mey.) Masee [Bas.: *Agaricus molybdites* G. Mey.; sin.: *Agaricus morganii* Peck, *A. glaziovii* Berkeley, *A. guadelupensis* Patouillard, *Annularia camporum* Speg., *Chlorophyllum esculentum* Masee, *C. morganii* (Peck) Masee, *Lepiota camporum* (Speg.) Speg., *L. esculenta* (Masee) Saccardo & P. Sydow, *L. molybdites* (G. Mey.) Sacc., *L. morganii* (Peck) Sacc., *L. ochrospora* Cooke & Masee, *Leucocoprinus molybdites* (G. Meyer) Patouillard, *Macrolepiota molybdites* (G. Meyer) G. Moreno, Bañares & Heykoop, *Mastocephalus molybdites* (G. Meyer) Kuntze, *M. morganii* (Peck) Kuntze, *Pholiota glaziovii* (Berkeley) Sacc.] es gregario, forman "anillos de hadas" en zonas abiertas de bosques de latifoliadas, crece en prados y parques en la ciudad de Buenos Aires y alrededores, provincia de Buenos Aires, Tucumán, Córdoba (Argentina) (48, 164), Escocia, Australia, Chipre, India, Japón, en el este de América del Norte y California, así como en regiones templadas y subtropicales de todo el mundo (10); ***Chlorophyllum rachodes*** (Vittad.) Vellinga [Bas.: *Agaricus rachodes* Vittad.; sin.: *Lepiota rachodes* (Vittad.) Quéf.; *Macrolepiota rachodes* (Vittad.) Singer] ("shaggy parasol") crece generalmente en bosques de coníferas en Tucumán y en Buenos Aires (Argentina) (48, 164). La especie también se escribe *rhacodes*; ***Chlorophyllum brunneum*** (Farl. & Burt) Vellinga [Bas.: *Lepiota brunnea* Farl. & Burt]; ***Chlorophyllum olivieri*** (Barla) Vellinga [Bas.: *Lepiota olivieri* Barla].

#### 2.1.10. Úlceras gástricas por consumo de *Leucocoprinus birnbaumii*

*Leucocoprinus birnbaumii* es un hongo saprotrofito que vive en materia vegetal muy descompuesta (humus o compost) de regiones tropicales y subtropicales; suele crecer en invernaderos y macetas.

**Sintomatología:** Trastornos gastrointestinales. Las toxinas de *Leucocoprinus birnbaumii* pueden causar úlceras gástricas si se ingieren (165).

**Toxinas:** Este frágil hongo, que es inofensivo para las plantas, debe su color amarillo a los inusuales alcaloides indólicos tóxicos **birnbauminas A** y **B** (Fig. 17), en los que se une una amida del ácido *N*-hidroxiindol-3-glioxílico a *N*-hidroxioxamidina a través de una unidad de tetrametileno. Las *N*-hidroxioxamidinas fueron descritas por primera vez en 2005 (166).



**Birnbaumina A: R = H**

**Birnbaumina B: R = OH**

Figura 17: Estructuras químicas de birnbaumina A y birnbaumina B.

**Especie causante del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Agaricaceae*; ***Leucocoprinus birnbaumii*** (Corda) Sing. [Bas.: *Agaricus birnbaumii* Corda; sin.: *Lepiota lutea* (Bolton) Godfrin, *Leucocoprinus luteus* (Bolton) Locq., *Lepiota flos-sulphuris* (Schnizl.) Mattir., *Leucocoprinus flos-sulphuris* (Schnizl.) Cejp; *Leucocoprinus luteus* (Bolton) Locq., *Lepiota coprinoides* Beeli] crece en

Argentina (provincias de Tucumán, Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba) (44, 48, 164) y en EE. UU. (Texas, Indiana, Florida, Oregon, New York) (165).

### 3. Tratamiento

El tratamiento de las intoxicaciones gastrointestinales suele ser de apoyo, especialmente en los cuadros de deshidratación grave. Se administran fluidos y electrolitos por vía intravenosa, con especial atención en niños y ancianos (10). Se puede usar metoclopramida en casos de vómitos recurrentes una vez que se han vaciado los contenidos gástricos (10).

Los medicamentos antiespasmódicos pueden disminuir los cólicos abdominales y el carbón activado ayuda en las primeras horas de internación para emover la toxina, evitando así su captación.

La intoxicación debida a la ingestión de *Entoloma nidorosum* y/o *E. rhodopolium* requiere tratamiento sintomático.

### 4. Conclusiones

En esta Parte 3 de esta serie de cuatro artículos sobre micetismos se han analizado los toxíndromes gastrointestinales o resinoides dentro de los llamados síndromes tempranos, por presentar períodos de latencia menores a 6 horas. Durante mucho tiempo se les restó importancia, y aún hoy en varios trabajos suele indicarse que las toxinas específicas no se conocen. Pero, en realidad, las sustancias responsables son muy distintas estructuralmente, desde proteínas hasta terpenoides, vinilglicina, fenol y azocompuestos, pero que provocan sintomatología muy similar. En este trabajo se seleccionaron diez ejemplos.

Una gran cantidad de hongos superiores provocan síntomas gastrointestinales de diferente gravedad, dependiendo también de la susceptibilidad del consumidor. Como muchos de los irritantes gastrointestinales son termolábiles, se recomienda proceder a una cocción intensa antes de ingerir cualquier macromiceto o bien hervir los carpóforos descartando el agua utilizada, antes de su cocción definitiva.

En cuanto a los tratamientos para los micetismos presentados se debe enfatizar la importancia de realizar un diagnóstico rápido y preciso, con la identificación de los carpóforos por servicios micológicos especializados. En la primera etapa de internación, es fundamental proceder a mejorar el cuadro de deshidratación mediante fluidos y electrolitos; el curso de este tipo de intoxicaciones suele ser favorable.

Es necesario realizar más investigación en el área, tanto desde el punto de vista químico, como bioquímico y médico, por eso contribuye a la temática el conocimiento del tipo de micetismos, sus toxinas y mecanismos y tratamientos posibles de la intoxicación para la adopción de las mejores prácticas clínicas.

En los centros médicos se requiere la adopción de protocolos de intervención claros y de fácil acceso para todos los profesionales de la salud.

El problema que subsiste es que, las intoxicaciones por ingestión de hongos superiores, aunque menos prevalentes que otras patologías, son también menos conocidas, y una estrategia equivocada o tardía puede ser fatal para el paciente.

### Agradecimientos:

Al Hospital de Clínicas y a la Universidad de Buenos Aires por la infraestructura brindada; al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (Mincyt, Argentina) por las facilidades de acceso a la biblioteca electrónica. A.B.P. es Investigadora Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

### Referencias:

1. Pomilio AB, Battista SM, Alonso A. Micetismos. Parte 1: Síndromes con período de latencia tardía. *Acta Bioq Clin Latinoamer*, 2018, en revisión.
2. Pomilio AB, Battista SM, Alonso A. Micetismos. Parte 2: Síndromes con sintomatología demorada y latencia muy larga. *Acta Bioquim Clin Latinoamer* 2018; en revisión.
3. Nilson S, Persson O. *Fungi of Northern Europe 1: Larger Fungi (Excluding Gill-Fungi)*. New York: Penguin, 1977.
4. Patočka J. Bolesatine, a toxic protein from the mushroom *Rubroboletus satanas*. *Mil Med Sci Lett (Voj Zdrav Listy)* 2018; 87 (1): 14-20.
5. Nuhn ME, Binder M, Taylor AFS, Halling RE, Hibbett DS. *Phylogenetic overview of the*

*Boletineae. Fungal Biol* 2013; 117 (7-8): 479-511.

6. Zhao K, Wu G, Yang ZL. A new genus, *Rubroboletus*, to accommodate *Boletus sinicus* and its allies. *Phytotaxa* 2014; 188 (2): 61-77.

7. Sesli E. Preliminary checklist of macromycetes of the East and Middle Black Sea Regions of Turkey. *Mycotaxon* 2007; 99: 71-4.

8. Biketova AY, Kosakyan A, Wasser SP, Nevo E. New, noteworthy, and rare species of the genus *Boletus* in Israel. *Plant Biosyst* 2015; 1-11.

9. Ammirati JA, Traquair JA, Horgen PA. *Poisonous Mushrooms of the Northern United States and Canada*. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1985.

10. Benjamin DR. *Mushrooms: Poisons and Panaceas — A Handbook for Naturalists, Mycologists and Physicians*. New York: WH Freeman and Company, 1995.

11. Schenk-Jaeger KM, Rauber-Lüthy C, Bodmer M, Kupferschmidt H, Kullak-Ublick GA, Ceschi A. Mushroom poisoning: A study on circumstances of exposure and patterns of toxicity. *Eur J Int Med* 2012; 23 (4): e85-e91.

12. Kretz O, Creppy EE, Dirheimer G. Characterization of bolesatine, a toxic protein from the mushroom *Boletus satanas* Lenz and its effects on kidney cells. *Toxicology* 1991; 66 (2): 213-24.

13. Kretz O, Creppy EE, Boulanger Y, Dirheimer G. Purification and some properties of bolesatine, a protein inhibiting *in vitro* protein synthesis, from the mushroom *Boletus satanas* Lenz (Boletaceae). *Arch Toxicol Suppl* 1989; 13: 422-7.

14. Kretz O, Reinbolt J, Creppy EE, Dirheimer G. Properties of bolesatine, a translational inhibitor from *Boletus satanas* Lenz. Amino-terminal sequence determination and inhibition of rat mitochondrial protein synthesis. *Toxicol Lett* 1992b; 64-5. Spec No: 763-6.

15. Kretz O, Creppy EE, Dirheimer G. Disposition of the toxic protein, bolesatine, in rats: its resistance to proteolytic enzymes. *Xenobiotica* 1991a; 21 (1): 65-73.

16. Wu G, Zhao K, Li YC, Zeng NK, Feng B, Halling R, et al. Four new genera of the fungal family Boletaceae. *Fungal Divers* 2016; 81 (1): 1-24.

17. Matsuura M, Yamada M, Saikawa Y, Miyairi K, Okuno T, Konno K, et al. Bolevenine, a toxic protein from the Japanese toadstool *Boletus venenatus*. *Phytochemistry* 2007; 68 (6): 893-8.

18. Horibe M, Kobayashi Y, Dohra H, Morita T, Murata T, Usui T, et al. Toxic isolectins from the mushroom *Boletus venenatus*. *Phytochemistry* 2010; 71 (5-6): 648-57.

19. Ennamany R, Lavergne JP, Reboud JP, Dirheimer G, Creppy EE. Mode of action of bolesatine, a cytotoxic glycoprotein from *Boletus satanas* Lenz. Mechanistic approaches. *Toxicology* 1995; 100 (1-3): 51-5.

20. Kretz O, Barbieri L, Creppy EE, Dirheimer G. Inhibition of protein synthesis in liver and kidney of mice by bolesatine: mechanistic approaches to the mode of action at the molecular level. *Toxicology* 1992; 73 (3): 297-304.

21. Ennamany R, Bingen A, Creppy EE, Kretz O, Gut JP, Dubuisson L, et al. Aspirin and heparin prevent hepatic blood stasis and thrombosis induced by the toxic glycoprotein bolesatine in mice. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17 (11): 620-4.

22. Licastro F, Morini M C, Kretz O, Dirheimer G, Creppy EE, Stirpe F. Mitogenic activity and immunological properties of bolesatine, a lectin isolated from the mushroom *Boletus satanas* Lenz. *Int J Biochem* 1993; 25 (5): 789-92.

23. Sarup Singh R, Preet Kaur H, Rakesh Kanwar J. Mushroom lectins as promising anticancer substances. *Curr Protein Pept Sci* 2016; 17 (8): 797-807.

24. Basset L, Ennamany R, Portail JP, Kretz O, Deffieux G, Badoc A, et al. Effects of bolesatine on a cell line from the SP2/O thymic lymphosarcoma. *Toxicology* 1995; 103 (2): 121-5.

25. Ennamany R, Kretz O, Creppy EE. Effect of bolesatine on phospholipid/calcium dependent protein kinase in Vero cells and in rat thymus. *Arch Toxicol* 1995; 69 (9): 624-30.

26. Ennamany R, Marzetto S, Saboureaux D, Creppy EE. Lipid peroxidation induced by bolesatine, a toxin of *Boletus satanas*: implication in m5dC variation in Vero cells related to inhibition of cell growth. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11 (6): 47-354.



27. Gachet C, Ennamany R, Kretz O, Ohlmann P, Krause C, Creppy EE, et al. Bolesatine induces agglutination of rat platelets and human erythrocytes and platelets *in vitro*. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15 (1): 26-9.
28. Assyov B, Bellanger JM, Bertéa P, Courtecuisse R, Koller G, Loizides M, et al. "Nomenclatural novelties". *Index Fungorum* 2015; (243).
29. Della Maggiora M. "Nomenclatural novelties"(PDF). *Index Fungorum* 2015; (246).
30. Nilsson S, Persson O. *Fungi of Northern Europe 2: Gill-Fungi*. Penguin, New York, 1977.
31. Chapman B, Xiao G, Myers S. Early results from field trials using *Hypholoma fasciculare* to reduce *Armillaria ostoyae* root disease. *Can J Bot* 2004; 82 (7): 962-9.
32. Doljak B, Stegnar M, Urleb U, Kreft S, Umek A, Ciglarič M, et al. Screening for selective thrombin inhibitors in mushrooms. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(2): 123-8.
33. Suzuki K, Fujimoto H, Yamazaki M. The toxic principles of *Naematoloma fasciculare*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1983; 31 (6): 2176-8.
34. Kubo I, Matsumoto A, Kozuka M, Wood WF. Calmodulin inhibitors from the bitter mushroom *Naematoloma fasciculare* (Fr.) Karst. (Strophariaceae) and absolute configuration of fasciculols. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1985; 33 (9): 3821-5.
35. Takahashi A, Kusano G, Ohta T, Ohizumi Y, Nozoe S. Fasciculic acids A, B and C as calmodulin antagonists from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1989; 37 (12): 3247-50.
36. Kim, D. S.; Baek, N. I.; Oh, S. R.; Jung, K. Y.; Lee, I. S.; Kim, J. H.; Lee, H. K. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Arch Pharm Res* 1997; 20 (3): 201-5.
37. Chen H-P, Liu J-K. Secondary metabolites from higher fungi. En: Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi S (editors). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Volumen 106, Cham, Suiza: Springer, 2017; pp. 1-201.
38. Shi XW, Li XJ, Gao JM, Zhang XC. Fasciculols H and I, two lanostane derivatives from Chinese mushroom *Naematoloma fasciculare*. *Chem Biodivers* 2011; 8 (10): 1864-70.
39. Kim KH, Moon E, Choi SU, Kim SY, Lee KR. Lanostane triterpenoids from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *J Nat Prod* 2013; 76 (5): 845-51.
40. Yaoita Y, Matsuki K, Iijima T, Nakano S, Kakuda R, Machida K, et al. New sterols and triterpenoids from four edible mushrooms. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001; 49 (5): 589-94.
41. Kim KH, Choi SU, Noh HJ, Zee O, Lee KR. Cytotoxic ergosterol derivatives from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *Nat Prod Sci* 2014; 20 (2): 76-9.
42. Ríos JL, Andújar I, Recio MC, Giner RM. Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. *J Nat Prod* 2012; 75 (11): 2016; -44.
43. Merdivan S, Lindequist U. Ergosterol peroxide: a mushroom-derived compound with promising biological activities - a review. *Int J Med Mushrooms* 2017; 19 (2): 93-105.
44. Wright JE, Albertó E. *Guía de hongos de la región pampeana. I. Hongos con laminillas*. Editorial LOLA, Buenos Aires, 2002.
45. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 2. *Coprinaceae and Strophariaceae*. *Mycotaxon* 2012; 120: 505.
46. Coimbra VRM. Checklist of Central and South American *Agaricales* (Basidiomycota). II: Strophariaceae. *Mycosphere* 2015; 6 (4): 441-58.
47. Franco-Molano AE, Corrales A, Vasco-Palacios AM. Macrohongos de Colombia II. Listado de especies de los órdenes *Agaricales*, *Boletales*, *Cantharellales* y *Russulales* (*Agaricomycetes*, *Basidiomycota*). *Actual Biología* 2010; 32: 89-114.
48. Raithelhuber J. *Nueva Flora Micológica Argentina*. Mycosur, Stuttgart, 2004.
49. Gill M, Strauch RJ. Constituents of *Agaricus xanthodermus* Geneviev: the first naturally endogenous azo compound and toxic phenolic metabolites. *Z. Naturforsch. C* 1984; 39 (11-12): 1027-9.
50. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 5. *Agaricaceae*. *Mycotaxon* 2013; 122: 491.
51. Grilli E. Studies on the genus *Hebeloma*, What is *H. versipelle* s. Bresadola? *Riv Micol*

- Romana, *Boll Assoc Micol Ecol Romana* 100-101, 2017; 33 (1-2): 39-50. [https://www.researchgate.net/publication/320466836\\_Studies\\_on\\_the\\_genus\\_Hebeloma\\_What\\_is\\_Hebeloma\\_versipelle\\_s\\_Bresadola](https://www.researchgate.net/publication/320466836_Studies_on_the_genus_Hebeloma_What_is_Hebeloma_versipelle_s_Bresadola). Fecha de acceso: 3 de septiembre de 2018.
52. Ho B-TQ, Pham N-DH, Shimizu K, Fukiharu T, Truong BN, Suzuki A. The first record of *Hebeloma vinosophyllum* (Strophariaceae) in Southeast Asia. *Mycotaxon* 2014; 128: 25-36.
53. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine Agaricales 7. Cortinariaceae and Entolomataceae. *Check List* 2014; 10 (1): 72-96.
54. Grilli E, Beker HJ, Eberhardt U, Schütz N, Leonardi M, Vizzini A. Unexpected species diversity and contrasting evolutionary hypotheses in *Hebeloma* (Agaricales) sections *Sinapizantia* and *Velutipes* in Europe. *Mycol Prog* 2016; 15 (5): 1-46.
55. Fujimoto H., Suzuki K., Hagiwara H., Yamazaki M. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. I. Structures of hebevinosides I, II, III, IV, and V. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 1986; 34 (1): 88-99.
56. Fujimoto H., Hagiwara H., Suzuki K., Yamazaki M. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. II. Isolation and structures of hebevinosides VI, VII, VIII, IX, X, and XI. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1987; 35 (6): 2254-60.
57. Fujimoto H, Maeda K, Yamazaki M. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. III. Isolation and structures of three new glycosides, hebevinosides XII, XIII and XIV, and productivity of the hebevinosides at three growth stages of the mushroom. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1991; 39 (8): 1958-61.
58. Fujimoto H, Takano Y, Yamazaki M. Isolation, identification and pharmacological studies on three toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma spoliatum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992; 40 (4): 869-72.
59. De Bernardi M., Fronza G., Gianotti M.P., Mellerio G., Vidari G., Vita-Finzi P. Fungal metabolites XIII: New cytotoxic triterpene from *Hebeloma* species (Basidiomycetes). *Tetrahedron Lett* ; 1983;24 (15): 1635-8.
60. Garlaschelli L, Vidari G, Virtuani M, Vita-Finzi P, Mellerio G. The structures of new lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens*. *J Nat Prod* 1995; 58 (7): 992-1002.
61. Shao HJ, Qing C, Wang F, Zhang YL, Luo DQ, Liu JK. A new cytotoxic lanostane triterpenoid from the basidiomycete *Hebeloma versipelle*. *J Antibiot* 2005; 58: 828-31.
62. Oliveira AG, Desjardin DE, Perry BA, Stevani CV. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. *Photochem Photobiol Sci* 2012; 11 (5): 848-52.
63. Kirchmair M, Morandell S, Stolz D, Pöder R, Sturmbauer C. Phylogeny of the genus *Omphalotus* based on nuclear ribosomal DNA-sequences. *Mycologia* 2004; 96 (6): 1253-60.
64. Bresinsky A, Besl H. *A Colour Atlas of Poisonous Fungi: a Handbook for Pharmacists, Doctors, and Biologists*. 1a ed, Wolfe Publishing Ltd., London, 1990.
65. Miller OK Jr. Observations on the genus *Omphalotus* in Australia. *Mycol Helv* 1994; 6 (2): 91-100.
66. Shirmila Jose G, Radhamany PM. Identification and determination of antioxidant constituents of bioluminescent mushroom. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2 (1 Suppl): S386-91.
67. Moreno G, Esteve-Raventós F, Pöder R, Ayala N. *Omphalotus olivascens* var. *indigo*, var. *nov.* from Baja California (Mexico). *Mycotaxon* 1993; 48: 217-22.
68. "*Omphalotus japonicus* (Kawam.) Kirchm. & O.K. Mill." *MycoBank*. International Mycological Association. Fecha de acceso: 23 de agosto de 2018.
69. Redhead SA, Neda H. (1741) Proposal to conserve the name *Pleurotus japonicus* against *Agaricus guepiniformis* and *Pleurotus harmandii* (Basidiomycota). *Taxon* 2006; 55 (4): 1032-3.
70. Norvell LL. Report of the Nomenclature Committee for Fungi: 14. *Taxon* 2008; 57 (2): 637-9.
71. Fukasawa Y, Osono T, Takeda H. Beech log decomposition by wood-inhabiting fungi in

- a cool temperate forest floor: a quantitative analysis focused on the decay activity of a dominant basidiomycete *Omphalotus guepiniformis*. *Ecol Res* 2010; 25: 959-66.
72. Ka KH, Park H, Hur TC, BAe WC. Formation of fruiting body of *Omphalotus japonicas* by sawdust cultivation. *Korean J Mycol* 2010; 38 (1): 80-2.
73. Yang ZL, Feng B. The genus *Omphalotus* (Omphalotaceae) in China. *Mycosystema* 2013; 32 (3): 545-56.
74. Tsurida S, Akai K, Hiwaki H, Suzuki A, Akiyama H. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Omphalotus guepiniformis* and *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76 (7): 1343-9.
75. Diaz JH. Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings. *Crit Care Med* 2005; 33 (2): 427-36.
76. Saviuc P, Danel V. New syndromes in mushroom poisoning. *Toxicol Rev* 2006; 25 (3): 199-209.
77. McMorris TC, Kelner MJ, Wang W, Estes LA, Montoya MA, Taetle R. Structure-activity relationship of illudins: analogs with improved therapeutic index. *J Org Chem* 1992; 57 (25): 6876-83.
78. McMorris TC, Anchel M. The structures of the basidiomycete metabolites illudin S and illudin M. *J Am Chem Soc* 1963; 85 (6): 831-2.
79. Arnone A, Cardillo R, Nasini G, de Pava OV. Secondary mould metabolites. Part 31. Isolation and structure elucidation of illudins A and B, and illudalenol, new sesquiterpenoids from *Clitocybe illudens*. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 1991; 733-7.
80. Liu J-K. N-Containing compounds of Macromycetes. *Chem Rev* 2005; 105 (7): 2723-44.
81. Tanaka K, Inoue T, Tezuka Y, Kikuchi T. Metabolism by rat liver cytosol of illudin S, a toxic substance of *Lampteromyces japonicus*. II. Characterization of illudin S-metabolizing enzyme. *Xenobiotica* 1992; 22: 33-9.
82. Tanaka K, Inoue T, Tezuka Y, Kikuchi T. Metabolism of illudin S, a toxic substance of *Lampteromyces japonicus*: urinary excretion of mercapturic acids in rat. *Xenobiotica* 1996; 26: 347-54.
83. Tanaka K, Inoue T, Tezuka Y, Kikuchi T. Michael-type addition of illudin S, a toxic substance from *Lampteromyces japonicus*, with cysteine and cysteine-containing peptides *in vitro*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996; 44: 273-9.
84. Kirchmair M. Identification of illudins in *Omphalotus nidiformis* and *Omphalotus olivascens* var. *indigo* by column liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999; 832 (1-2): 247-52.
85. Burgess ML, Zhang YL, Barrow KD. Characterization of new illudanes, illudins F, G, and H from the basidiomycete *Omphalotus nidiformis*. *J Nat Prod* 1999; 62 (11): 1542-4.
86. Beattie KD, Ulrich R, Grice ID, Uddin SJ, Blake TB, Wood KA; et al. Ethanolic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth *in vitro*. *Mycologia* 2011; 103 (3): 458-65.
87. Sterner O., Etzel W., Mayer A., Anke H. Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius* II. Isolation and structure determination. *Nat Prod Lett* 1997; 10 (1): 33-8.
88. Mayer A., Anke H., Sterner O. Omphalotin, A new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and biological activity. *Nat Prod Lett* 1997; 10 (1): 25-32.
89. Mayer A., Kilian M., Hoster B., Sterner O., Anke H. *In vitro* and *in vivo* nematocidal activities of the cyclic dodecapeptide omphalotin A. *Pestic. Sci.* 1999; 55 (1): 27-30.
90. Liermann J. C., Opatz T., Kolshorn H., Antelo L., Hof C., Anke H. Omphalotins E-I, five oxidatively modified nematocidal cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. *Eur. J. Org. Chem.* 2009; 2009 (8): 1256-62.
91. Schobert R, Knauer S, Seibt S, Biersack B. Anticancer active illudins: recent developments of a potent alkylating compound class. *Curr Med Chem* 2011; 18 (6): 790-807.
92. Baekelandt M. Irofulven (MGI Pharma). *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3 (10): 1517-26.

93. Staake MD, Kashinatham A, McMorris TC, Estes LA, Kelner MJ. Hydroxyurea derivatives of irofulven with improved antitumor efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26 (7): 1836-8.
94. Yue Q, Gao G, Zou G, Yu H, Zheng X. Natural products as adjunctive treatment for pancreatic cancer: recent trends and advancements. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 8412508.
95. Wawrzyn GT, Quin MB, Choudhary S, López-Gallego F, Schmidt-Dannert C. Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota. *Chem Biol* 2012; 19 (6): 772-83.
96. Ortega A, Esteve-Raventós F, Gómez J, Reyes J D. Contributo allo studio della micoflora dell' Andalusia (Spagna), XIV, Agaricales VII. *Boll Gruppo Micol G. Bresadola, Nuova Seria BGMB* 2000; 43 (1): 45-7.
97. Klemm G. Beobachtungen über den Verlauf einer Massenvergiftung mit dem Bruchkreizker *Lactarius helvus* Fries. *Mykol Mitteilungsbl* 1961; 5: 1-4.
98. Arora D. All that the Rain Promises and More: A Hip Pocket Guide to Western Mushrooms. Berkeley, California: Ten Speed Press. 1991; p. 19.
99. Reichl F-X, Ritter L. Illustrated Handbook of Toxicology. Stuttgart, Alemania: Thieme. 2011; p. 296.
100. Barceloux DG. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*. John Wiley & Sons, Inc. 2008.
101. Sterner O, Bergman R, Kihlberg J, Wickberg B. *The sesquiterpenes of Lactarius vellereus and their role in a proposed chemical defense system*. *J Nat Prod* 1985; 48 (2): 279-88.
102. Anke H, Sterner O. *Comparison of the antimicrobial and cytotoxic activities of twenty unsaturated sesquiterpene dialdehydes from plants and mushrooms*. *Planta Med* 1991; 57 (4): 344-6.
103. Gry J, Andersson C. *Mushrooms traded as food*. Vol. II, sec. 2. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Dinamarca, 2014.
104. Gilardoni G, Malagòn O, Tosi S, Clericuzio M, Vidari G. Lactarane sesquiterpenes from the European mushrooms *Lactarius aurantiacus*, *L. subdulcis*, and *Russula sanguinaria*. *Nat Prod Commun* 2014; 9 (3): 319-22.
105. Vidari G, Vita-Finzi P. *Sesquiterpenes and other secondary metabolites of genus Lactarius (Basidiomycetes): Chemistry and biological activity*. En: Atta-ur-Rahman (ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 17, Part D, Elsevier, 1995; pp. 153-206.
106. Kobata K, Kano S, Shibata H. *New lactarane sesquiterpenoid from the fungus Russula emetica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59 (2): 316-8.
107. Rapior S, Fons F, Bessière J-M. *The fenugreek odor of Lactarius helvus*. *Mycologia* 2000; 92 (2): 305-8.
108. Dickschat JS. Fungal volatiles - a survey from edible mushrooms to moulds. *Nat Prod Rep* 2017; 34 (3): 310-28.
109. Suortti T. Improved analytical and preparative methods for necatorin from *Lactarius necator* (Fr.) Karst. mushroom. *J Chromatogr* 1984; 301 (1): 303-7.
110. Suortti T. Stability of necatorin, a highly mutagenic compound from *Lactarius necator* mushroom. *Food Chem. Toxicol* 1984; 22 (7): 579-81.
111. Klamann J-D, Fugmann B, Steglich W. Alkaloidal pigments from *Lactarius necator* and *L. atroviridis*. *Phytochemistry* 1989; 28 (12): 3519-22.
112. Tanaka Y, Kawahara S, Eng AH, Takei A, Ohya N. Structure of *cis*-polyisoprene from *Lactarius* mushrooms. *Acta Biochim Pol* 1994; 41 (3): 303-9.
113. Tanaka Y, Kawahara S, Aikhowe E, Shiba K, Ohya N. *Initiation of biosynthesis in cis polyisoprenes*. *Phytochemistry* 1995; 39 (4): 779-84.
114. Panchak LV, Antoniuk VO. [Purification of lectin from fruiting bodies of *Lactarius rufus* (Scop.: Fr.) Fr. and its carbohydrate specificity]. Artículo en idioma Ucraniano, resumen en inglés. *Ukr Biokhim Zh* 2007; 79 (2): 123-8.
115. Kobata K, Wada T, Hayashi Y, Shibata H. Volemolide, a novel norsterol from the fungus *Lactarius volemus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994; 58 (8): 1542-4.



116. Sivakumar M, Bhat SV, Nagasampagi BA. *Volemitol en L. volemus*. En: *Chemistry of Natural Products*. Berlin, Germany: Springer. 2005; p. 495.
117. Yue J-M, Chen S-N, Lin Z-W, Sun H-D. Sterols from the fungus *Lactarius volemus*. *Phytochemistry* 2001; 56 (8): 801-6.
118. Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K. Analysis of indole compounds in edible *Basidiomycota* species after thermal processing. *Food Chem* 2012; 132 (1): 455-9.
119. Muszyńska B, Maślanka A, Sułkowska-Ziaja K, Krzek J. TLC-UV analysis of indole compounds and other nitrogen-containing bases in the fruiting bodies of *Lactarius deterrimus*. *J Planar Chromatogr* 2007; 20 (1): 57-60.
120. Stone TW, Mackay GM, Forrest CM, Clark CJ, Darlington LG. Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (7): 852-9.
121. Guillot J, Giollant M, Damez M, Dusser M. Isolation and characterization of a lectin from the mushroom *Lactarius deliciosus*. *J Biochem* 1991; 109 (6): 840-5.
122. Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E. Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. *Plant Physiol* 1993; 101 (2): 513-22.
123. Bergendorff O, Sterner O. The sesquiterpenes of *Lactarius deliciosus* and *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry* 1988; 27 (1): 97-100.
124. Koul SK, Taneja Sc, Ibrahim SP, Dhar KL, Atal CK. A C-formylated azulene from *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry* 1985; 24 (1): 181-2.
125. Niveiro N, Popoff OF, Albertó EO. Hongos comestibles silvestres: Especies exóticas de *Suillus* (Boletales, Basidiomycota) y *Lactarius* (Russulales, Basidiomycota) asociadas a cultivos de *Pinus elliottii* del Nordeste Argentino. *Bonplandia* 2009; 18 (1): 65-71.
126. Barroetaveña C, Cázares E, Rajchenberg M. *Ectomycorrhizal fungi associated with ponderosa pine and Douglas-fir: a comparison of species richness in native western North American forests and Patagonian plantations from Argentina*. *Mycorrhiza* 2007; 17 (5): 355-73.
127. Suzuki K, Une T, Fujimoto H, Yamazaki M. [Studies on the toxic components of *Rhodophyllus rhodopolius*. I. The biological activities and screening of the toxic principles]. Artículo en idioma japonés. *Yakugaku Zasshi* 1987; 107 (12): 971-7.
128. Suzuki K, Une T, Yamazaki M. [Studies on the toxic components of *Rhodophyllus rhodopolius*. II. Partial purification and properties of the hemolysin from *Rhodophyllus rhodopolius*: examination on the condition of the hemolysis]. Artículo en idioma japonés. *Yakugaku Zasshi* 1988; 108 (3): 221-5.
129. Suzuki K, Une T, Yamazaki M, Takeda T. Purification and some properties of a hemolysin from the poisonous mushroom *Rhodophyllus rhodopolius*. *Toxicon* 1990; 28 (9): 1019-28.
130. Chapuis J-R. *Jahresbericht des Verbandstoxikologen für das Jahr 1983*. *Schweiz Z Pilzk* 1984; 62: 196-7.
131. Bocchi A, Bracchi PG, Delbono G, Cadonici O. *Segnalazioni di intossicazioni da funghi nel Parmense*. *Ann Fac Medic Vet di Parma* 1995; 15: 251-6.
132. Trueb L, Carron P-N, Saviuc P. Intoxication par les champignons. *Rev Med Suisse* 2013; 9: 1465-72.
133. Kondo K, Nakamura K, Ishigaki T, Sakata K, Obitsu S, Noguchi A, et al. Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Sci Rep* 2017; 7: Article number: 14942.
134. Alder AE. Die Pilzvergiftungen in der Schweiz, während 40 Jahren. *Bull Suisse Mycol* 1960; 38: 65-73.
135. Shidei Y. A case report of poisoning by a *Rhodophyllus* sp. probably *Rhodophyllus rhodopolius*. *Trans Mycol Soc Jpn* 1976; 17: 95-6.
136. Alder AE. *Erkennung und Behandlung der Pilzvergiftung*. *Dtsch Med Wochenschr* 1961; 86 (23): 1121-7.
137. Maeder A. Rapport toxicologique 1974. *Bull Suisse Mycol* 1975; 53: 150-4.
138. Ishihara Y, Yamaura Y. Descriptive epidemiology of mushroom poisoning in Japan. (*Nippon Eiseigaku Zasshi*) *Japan J Hyg* 1992; 46 (6): 1071-8.

139. Azéma RC. Mycotoxicologie. *Bull Soc Mycol Fr* 1982; 98: 23-9.
140. Bastida J, Viladomat F, Llabrés JM, Codina C. Screening of higher fungi from Catalonia for alkaloids-II. *Int J Crude Drug Res* 1987; 25 (3): 129-32.
141. Tuzen M, Sesli E, Soylak M. Trace element levels of mushroom species from East Black Sea region of Turkey. *Food Control* 2007; 18 (7): 806-10.
142. Falandysz J. Mercury in mushrooms and soil of the Tarnobrzaska Plain, south-eastern Poland. *J Environ Sci Health, Part A* 2002; 37 (3): 343-52.
143. Byrne AR, Slejkovec Z, Stijve T, Fay L, Gössler W, Gailer J, et al. Arsenobetaine and other arsenic species in mushrooms. *Appl Organometallic Chem* 1995; 9 (4): 305-13.
144. Maki T, Takahashi K, Shibata S. Isolation of the vomiting principles from the mushroom *Rhodophyllus rhodopolius*. *J Agric Food Chem* 1985; 33: 1204-5.
145. Agerer R. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Schwäbisch Gmünd: Einhorn-Verlag. 2002; pp. 116-7.
146. Knudsen H, Vesterholt J. (eds) *Funga Nordica: agaricoid, boletoid and cyphelloid genera*. Nordsvamp, 2008.
147. Odenthal KP, Seeger R, Braatz R, Petzinger E, Moshaf H, Schmitz-Dräger C. Damage *in vitro* to various organs and tissues by rubescenslysin from the edible mushroom *Amanita rubescens*. *Toxicon* 1982; 20 (4): 765-81.
148. Albertó E. Síndrome de Intoxicación producido por el hongo *Chlorophyllum molybdites*. Síntomas y Diagnostico Botánico. *Bol Farmacoterap Toxicol* 2001;8: 13-20.
149. Romano GM, Iannone L, Novas MV, Carmarán C, Romero AI, Lopez SE, Lechner BE. Hongos tóxicos en la ciudad de Buenos Aires y alrededores. *Medicina (Buenos Aires)* 2013; 73: 406-10.
150. Blayney D, Rosenkranz E, Zettner A. Mushroom poisoning from *Chlorophyllum molybdites*. *West J Med* 1980; 132 (1): 74-7.
151. Ge Z-W, Jacobs A, Vellinga EC, Sysouphanthong P, van der Walt R, et al. A multi-gene phylogeny of *Chlorophyllum* (Agaricaceae, Basidiomycota): new species, new combination and infrageneric classification. *MycKeys* 2018; (32): 65-90.
152. [Chlorophyllum molybdites](http://urbanmushrooms.com/index.php?id=4). En: Urban mushrooms. Accesible en: <http://urbanmushrooms.com/index.php?id=4>. Fecha de acceso: 23 de agosto de 2018.
153. Stenklyft PH, Augenstein WL. *Chlorophyllum molybdites*-severe mushroom poisoning in a child. *J Toxicol Clin Toxicol* 1990; 28 (2): 159-68.
154. Lehmann PF, Khazan U. Mushroom poisoning by *Chlorophyllum molybdites* in the Midwest United States. Cases and a review of the syndrome. *Mycopathologia* 1992; 118 (1): 3-13. Comentario en: Rippon JW. Mycetismus 'mushroom poisoning'. *Mycopathologia* 1992; 118 (1): 1-2.
155. Schmitt C, Pineau-Delabi F, Olivier J, Simon N, de Haro L. Intoxication par ingestion de *Chlorophyllum molybdites* sur l'Île de la Réunion: à propos d'un cas. [*Chlorophyllum molybdites* poisoning in Reunion Island: A case study]. *Toxicol Anal Clin* 2016; 28 (2): 143-5.
156. Bijeesh C, Vrinda KB, Pradeep CK. Mushroom poisoning by *Chlorophyllum molybdites* in Kerala. *J Mycopathol Res* 2017; 54 (4): 477-83.
157. Eilers FI, Nelson LR. Characterization and partial purification of the toxin of *Lepiota morgani*. *Toxicon* 1974; 12 (6): 557-63.
158. Yamada M, Tokumitsu N, Saikawa Y, Nakata M, Asano J, Miyairi K, et al. Molybdophyllisin, a toxic metalloendopeptidase from the tropical toadstool, *Chlorophyllum molybdites*. *Bioorg Med Chem* 2012; 20 (22): 6583-8.
159. Ohta T, Inoue H, Kusano G, Oshima Y. Lepiotins A and B, new alkaloids from the mushrooms, *Macrolepiota neomastoidea* and *Chlorophyllum molybdites*. *Heterocycles* 1998; 47 (2): 883-91.
160. Yoshikawa K, Ikuta M, Arihara S, Matsumura E, Katayama S. Two new steroidal derivatives from the fruit body of *Chlorophyllum molybdites*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001; 49 (8): 1030-2.
161. Kobayashi Y, Kobayashi K, Umehara K, Dohra H, Murata T, Usui T, et al.

- Purification, characterization, and sugar binding specificity of an *N*-glycolylneuraminic acid-specific lectin from the mushroom *Chlorophyllum molybdites*. *J Biol Chem* 2004; 279 (51): 53048-55.
162. Su Z, Wang P, Yuan W, Li S. Chemical constituents from the fruit body of *Chlorophyllum molybdites*. *Nat Prod Commun* 2013; 8 (9): 1227-8.
163. Al-Fatimi M, Schröder G, Kreisel H, Lindequist U. Biological activities of selected basidiomycetes from Yemen. *Pharmazie* 2013; 68 (3): 221-6.
164. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine Agaricales 5. Agaricaceae. *Mycotaxon* 2013; 122: 491.
165. Kuo M. *Leucocoprinus birnbaumii*. MushroomExpert.Com, Accesible en: [http://www.mushroomexpert.com/leucocoprinus\\_birnbaumii.html](http://www.mushroomexpert.com/leucocoprinus_birnbaumii.html). Fecha de acceso: 3 de septiembre de 2018.
166. Bartsch A, Bross M, Spiteller P, Spiteller M, Steglich W. Birnbaumin A and B: two unusual 1-hydroxy- indole pigments from the "flower pot parasol" *Leucocoprinus birnbaumii*. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44 (19): 2957-9.

## MICETISMOS. (PARTE 4) : SÍNDROMES TEMPRANOS CON SÍNTOMAS COMPLEJOS

Alicia B. Pomilio<sup>a</sup>, Stella M. Battista<sup>b</sup>, Ángel Alonso<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Química y Bioquímica Estructural, Depto de Bioquímica Clínica, Hosp de Clínicas, UBA, Microbiología, Cátedra II, Fac. Med., SCA, ANCBA.

**Título en inglés:** Mushroom poisonings. Part 4: early-onset syndromes with complex symptoms.

### Resumen

En esta Parte 4 de la serie de cuatro artículos sobre micetismos se analizan los síndromes que se caracterizan por presentar un período de latencia muy corto, con la aparición de síntomas complejos en menos de 6 horas después de la ingestión de los macromicetos.

Se discuten los siguientes micetismos:

1) Toxíndrome muscarínico o colinérgico periférico por especies de *Inocybe* y *Clitocybe*. 2) Toxíndrome inmuno-hemolítico o hemolítico por *Paxillus*. 3) Toxíndrome neumónico alérgico por *Lycoperdon perlatum* y por *Pholiota nameko*. 4) Toxíndrome panterínico o neurotóxico glutaminérgico por compuestos isoxazólicos o síndrome *pantherinal/muscaria*. 5) Toxíndrome coprínico o cardiovascular. 6) Toxíndrome neurotóxico alucinogénico por psilocibina y derivados indólicos. 7) Toxíndrome psicotrópico por estirilpironas y gimnopilinas de *Gymnopilus spectabilis* o *G. junonius*. 8) Toxíndrome agudo de rhabdomiolisis por *Russula subnigricans*. 9) Toxíndrome cianogénico por *Marasmius oreades*. 10) Toxíndrome inmunosupresor por tricotecenos macrocíclicos de *Podostroma cornu-damae*. 11) Toxíndrome hemolítico debido a ostreolisina de *Pleurotus ostreatus* y especies relacionadas. Se analizan los síntomas, las toxinas involucradas, los mecanismos de acción, cuando se conocen, y las especies causantes de los micetismos.

**Palabras clave:** Micetismos tempranos \* toxíndromes con síntomas complejos \* *Lycoperdon perlatum*, *Pholiota nameko*, *Amanita pantherinal/Amanita muscaria*, *Gymnopilus spectabilis* (*G. junonius*), *Russula subnigricans*, *Marasmius oreades*, *Pleurotus ostreatus* \* especies de los géneros *Inocybe*, *Clitocybe* y *Paxillus* \* toxinas \* tratamiento de los pacientes.

### Abstract

This Part 4 of the series of four articles on mushroom poisonings refers to early-onset syndromes, which are characterized by a very short latency period, and the appearance of complex symptoms in less than 6 hours after mushroom ingestion. The following mycetisms are discussed, (1) Peripheral cholinergic, or muscarinic syndrome due to *Inocybe* and *Clitocybe* species. (2) Immuno-haemolytic or haemolytic syndrome by *Paxillus*. (3) Allergic pneumonic syndrome due to *Lycoperdon perlatum*, and *Pholiota nameko*. (4) Glutaminergic neurotoxic, or pantherinic syndrome by isoxazole compounds or *pantherinal/muscaria* syndrome. (5) Coprinic, or cardiovascular syndrome. (6) Hallucinogenic neurotoxic syndrome due to psilocybin and indole derivatives. (7) Psychotropic syndrome by styrylpirones and gymnopilins of *Gymnopilus spectabilis* or *G. junonius*. (8) Rhabdomyolysis acute syndrome due to *Russula subnigricans*. (9) Cyanogenic syndrome by *Marasmius oreades*. (10) Immunosuppressive syndrome by macrocyclic trichothecenes of *Podostroma cornu-damae*. (11) Haemolytic syndrome due to ostreolisine of *Pleurotus ostreatus*, and related species. The symptoms, toxins involved, mechanisms of action, when known, and the species of mushrooms responsible for the mycetisms are analyzed.

**Key words:** early-onset mycetisms \* toxindromes with complex symptoms \* *Lycoperdon perlatum*, *Pholiota nameko*, *Amanita pantherinal/A. muscaria*, *Gymnopilus spectabilis* (*G. junonius*), *Russula subnigricans*, *Marasmius oreades*, *Pleurotus ostreatus* \* species of the genera *Inocybe*, *Clitocybe*, and *Paxillus* \* toxins \* patient treatment.

### 1. Introducción

El **grupo 3**, Parte 4, comprende los siguientes micetismos tempranos:

- 1) Toxíndrome muscarínico o colinérgico periférico. Micetismo por especies de *Inocybe* y *Clitocybe*.
- 2) Toxíndrome inmuohemolítico o hemolítico. Micetismo por *Paxillus*.
- 3) Toxíndrome neumónico alérgico. Licoperdonosis o micetismo por *Lycoperdonperlatum* y por *Pholiota nameko*.
- 4) Toxíndrome panterínico o neurotóxico glutaminérgico. Micetismo por compuestos isoxazólicos o síndrome *pantherinal/muscaria*.
- 5) Toxíndrome coprínico o cardiovascular. Micetismo inducido por alcohol o reacción tipo disulfiram.
- 6) Toxíndrome neurotóxico alucinogénico. Micetismo por psilocibina y derivados indólicos.
- 7) Toxíndrome psicotrópico por estirilpironas y gimnopilinas. Micetismo debido al hongo alucinogénico *Gymnopilus spectabilis* o *G. junonius*.
- 8) Toxíndrome agudo de rabdomiólisis. Micetismo por *Russula subnigricans*.
- 9) Toxíndrome cianogénico. Micetismo por *Marasmius oreades*.
- 10) Toxíndrome inmunosupresor. Micetismo por tricotecenos macrocíclicos de *Podostroma cornu-damae*.
- 11) Toxíndrome hemolítico debido a ostreolisina de *Pleurotus ostreatus* y especies relacionadas.

## 2. Análisis de cada síndrome del micetismo principal considerado

### **GRUPO 3, Parte 4: Micetismos tempranos con síntomas complejos**

#### **2.1. Toxíndrome muscarínico o colinérgico periférico. Micetismo por especies de *Inocybe* y *Clitocybe*:**

Los hongos responsables de este micetismo son especies de *Inocybe* y *Clitocybe*.

**Período de latencia:** Es muy breve, apareciendo los primeros síntomas entre los 15 y 30 minutos hasta 2 horas después de la ingestión.

**Síntomatología:** En general, los síntomas son moderados y desaparecen de manera natural dentro de las 24 horas; en los casos leves los pacientes se recuperan a las 6 horas. Los síntomas usuales son: sudoración intensa que empapa al paciente, aumento importante de salivación, lagrimeo, micción, secreciones bronquiales (broncorrea), diaforesis, broncoespasmo, miosis y visión borrosa. También náuseas, vómitos, diarrea escasa, dolor abdominal, cólicos y dificultad para respirar. Los efectos cardiovasculares corresponden a bradicardia, hipotensión, pulso irregular y/o shock en los casos más graves (4).

A diferencia de la acetilcolina, la muscarina no es hidrolizada por las acetilcolinesterasas plasmáticas, y sus efectos colinérgicos periféricos generalmente duran varias horas después de la ingestión de hongos crudos o cocidos que contienen muscarina.

En algunos casos graves, como los debidos a *Inocybe patouillardii*, se produce la muerte debido a insuficiencia respiratoria.

**Toxinas:** La toxina responsable es la **muscarina** (Fig. 1). Su nombre deriva de haber sido encontrada en *Amanita muscaria*, aunque, en muy pequeñas cantidades.

Las pequeñas especies blancas de *Clitocybe* contienen muscarina en cantidades peligrosas, y dos especies en particular, las estrechamente relacionadas *Clitocybe dealbata* y *C. rivulosa*, contienen muscarina en cantidades tales que se han registrado muertes por ingerirlas.

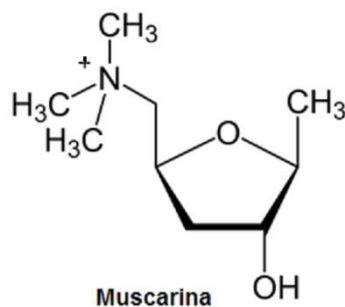


Figura 1: Estructura química de muscarina.

**Mecanismo de acción:** La muscarina es estructuralmente similar a la acetilcolina y causa toxicidad al unirse a las neuronas colinérgicas posganglionares en el sistema nervioso autónomo. **La muscarina no puede estimular a los receptores colinérgicos nicotínicos ni cruzar la barrera hematoencefálica para causar un síndrome colinérgico central (4).**

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Tricholomataceae*: especies del género *Clitocybe*: *Clitocybe candicans* (Pers.) P. Kumm. crece en Europa; *Clitocybe dealbata* (Sowerby) Gillet [Bas.: *Agaricus dealbatus* Sowerby] crece en Europa, en Norteamérica y en Argentina (Tierra del Fuego); *C. ericetorum* Qué. crece en Francia; *C. gracilipes* Lamoure; *Clitocybe phyllophila* (Pers.) P. Kumm. [Bas.: *Agaricus phyllophilus* Pers.; sin.: *Clitocybe cerussata* (Fr.) P. Kumm., *C. cerussata* var. *pithyophila* (Fr.) J.E. Lange, *C. pithyophila* (Fr.) Gillet] crece en Europa, en Norteamérica y en América del Sur (Brasil); *Clitocybe rivulosa* (Pers.) P. Kumm. [Bas.: *Agaricus rivulosus* Pers.] crece en Europa, Norteamérica y Argentina (Buenos Aires) (5). Familia: *Cortinariaceae*: especies del género *Inocybe* (6): *Inocybe asterospora* Qué.; *I. bongardii* (Weinm.) Qué.; *I. caesariata* (Fr.) P. Karst.; *I. cervicolor* (Pers.) Qué.; *I. erubescens* A. Blytt. [Sin.: *I. patouillardii* Bres.] intoxicaciones en Reino Unido y en Israel; *I. rimosa* (Bull.) P. Kumm. [Bas.: *Agaricus rimosus* Bull.; sin.: *Agaricus fastigiatus* Schaeff., *Inocybe fastigiata* (Schaeff.) Qué.] crece en Buenos Aires (Argentina) (6), en Israel y en Europa; *I. geophylla* (Sowerby) P. Kumm. crece en Europa, Israel y, Australia, y América del Norte; *I. geophyllavar. lilacina* Gillet crece en Buenos Aires (6, 8) y en América del Norte; *I. geophyllomorpha* Singer crece en Argentina (provincias de Neuquén, Río Negro y Tierra del Fuego) (6, 7); *I. godeyi* Gillet; *I. griseolilacina* J.E. Lange; *I. hirtella* Bres.; *I. lacera* (Fr.) P. Kumm. crece en Europa; *I. laceraf. gracilis* J.E. Lange [Sin.: *Agaricus lacerus* Fr.] crece en Buenos Aires (6-9); *I. langei* R. Heim crece en Buenos Aires (6, 7, 9) y en Europa (España, Italia, Francia); *I. maculata* Boud.; *I. mixtilis* (Britzelm.) Sacc.; *I. mixtiliformis* Singer [Sin.: *Astrosporina mixtiliformis* (Singer) Raithelh.] crece en Argentina (provincias de Neuquén y Río Negro) (6, 7); *I. napipes* J.E. Lange [= *Astrosporina napipes* (J.E. Lange) A. Pearson] crece en Argentina (provincia de Tucumán) (6, 7) y en Europa; *I. praetervisa* Qué.; *I. pusio* P. Karst.

## **2.2. Toxíndrome inmuno-hemolítico o hemolítico. Micetismo por *Paxillus*:**

El síndrome de *Paxillus* es una reacción inmunoalérgica rara y potencialmente mortal que puede ocurrir por el consumo de varias especies de hongos no comestibles, como: *Paxillus involutus* y posiblemente *Suillellus luridus* (anteriormente denominado *Boletus luridus*) y *Clitocybe claviceps* (10, 11). Hasta hace algunos años, se consideraba que el carpóforo de *Paxillus involutus* era comestible, pero el hecho de que haya causado varias muertes en Europa ha llevado a países como Alemania a prohibir su venta.

**Período de latencia:** De media hora hasta tres o cuatro horas después de la ingestión.

**Síntomatología:** Este síndrome se caracteriza por un inicio agudo de **síntomas de gastroenteritis** (dolores abdominales, diarrea, náuseas, vómitos, sudores, fatiga y frío en brazos y piernas) después del período de latencia, **seguido de una anemia hemolítica aguda**, mediada por un complejo inmune, **con hemoglobinuria**, oliguria, anuria e **insuficiencia renal** por nefritis de complejo inmune, posiblemente iniciada por una respuesta alérgica a un componente de proteína antigénica común en *Paxillus* y *Boletus*, **involutina** (10, 11). En el caso de consumir los carpóforos crudos, mal cocidos, en gran cantidad o repetidamente, aún cocinándolos, puede producirse una hemólisis grave, que puede ser mortal. El ejemplo clásico es la muerte del micólogo austríaco F. Neumann, quien en 1945, durante la segunda guerra mundial, murió como consecuencia del consumo de carpóforos crudos de *P. involutus*, por falta de combustible para cocinarlos.

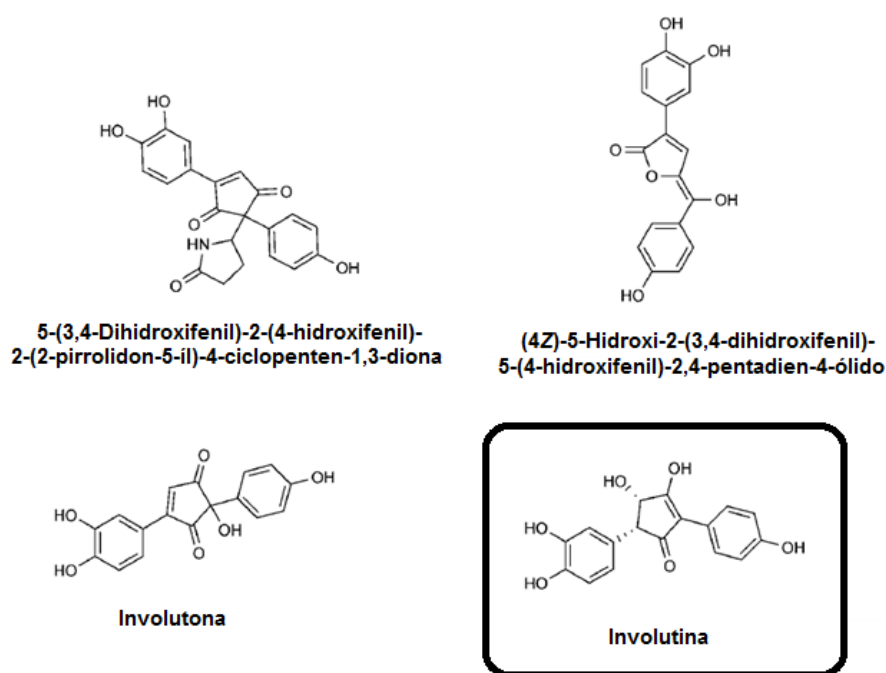
**La anemia, que es el síndrome esencial (síndrome paxílico o paxiliano) es de naturaleza inmuno-hemolítica.** Es frecuente que la persona intoxicada, siguiendo un tratamiento adecuado, se recupere al cabo de siete días; sólo en los casos de hemólisis grave, puede sobrevenir la muerte.



En los casos graves la intoxicación cursa con intensa pigmentación de la orina, hipotensión grave, dolor lumbar, oligoanuria posterior y colapso.

**Toxinas:** La toxina responsable de la intoxicaciones **involutina** (Fig. 2), que es una diarilciclopentenona **termolábil, que por lo tanto es destruida en parte por la cocción prolongada.** **Involutina** se encuentra en algunos hongos del género *Paxillus*, entre ellos *Paxillus involutus* (12). Esta sustancia es tóxica y responsable del síndrome paxílico, síndrome alérgico causado por la ingestión del hongo (13). En contacto con el aire, la involutina se oxida, dando lugar a compuestos que determinan el color marrón de los hongos que la contienen (14).

Los compuestos químicos obtenidos de carpóforos de *P. involutus* correspondieron a: ácidos grasos, carbohidratos, esteroides, péptidos y otros compuestos con nitrógeno (entre ellos, trazas de muscarina) y los pigmentos involutina [(4*S*,5*R*)-5-(3,4-dihidroxifenil)-2-(4-hidroxifenil)-3,4-dihidroxiciclopent-2-en-1-ona], involutona [5-(3,4-dihidroxifenil)-2-(4-hidroxifenil)-2-hidroxi-4-ciclopenten-1,3-diona], 5-(3,4-dihidroxifenil)-2-(4-hidroxifenil)-2-(2-pirrolidon-5-íl)-4-ciclopenteno-1,3-diona y (4*Z*)-5-hidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-5-(4-hidroxifenil)-2,4-pentadien-4-ólido (Fig. 2) (12, 15, 16).



**Figura 2:** Estructuras químicas de 5-(3,4-dihidroxifenil)-2-(4-hidroxifenil)-2-(2-pirrolidon-5-íl)-4-ciclopenten-1,3-diona, (4*Z*)-5-hidroxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-5-(4-hidroxifenil)-2,4-pentadien-4-ólido, involutona e involutina.

**Mecanismo de acción:** Se ha demostrado que la intoxicación mortal debida a *Paxillus involutus*, en particular la hemólisis grave, es causada por anticuerpos contra el hongo en pacientes sensibilizados (11). Es por eso que los cuadros tóxicos afectan a determinadas personas y a otras no. Más aún, mucha gente ha comido este hongo alguna vez, previa cocción, sin ningún problema.

Los anticuerpos de convalecientes de inmunoglobulina G (IgG) sérica contra un extracto de *Paxillus* que contiene involutina se han detectado mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación en varios pacientes con el síndrome de *Paxillus* agudo (10, 11). También se detectaron anticuerpos IgG específicos contra partículas de la membrana de *Paxillus involutus* mediante esos ensayos en el suero de pacientes.

La secuencia de reacciones resultante de los ensayos sugiere fuertemente la formación de complejos inmunes. Es probable que estos complejos se unan a los eritrocitos que han

estado presentes sin intervenir. La activación del sistema del complemento finalmente produce hemólisis y shock. Además del tratamiento adecuado del shock, la eliminación de estos complejos inmunes circulantes mediante separación del plasma parece ser la terapia de elección (11).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Boletales*; Familia: *Paxillaceae*: *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. [Bas.: *Agaricus involutus* Batsch] crece en Argentina (provincias de Salta, Tucumán, Córdoba, Neuquén, Río Negro y Tierra del Fuego) (7, 9, 17) y en bosques de coníferas en el hemisferio norte, en toda Europa y Asia, América del Norte, Japón y en el este de Anatolia en Turquía; *Paxillus filamentosus* (Scop.) Fr. [Bas.: *Agaricus filamentosus* Scop.; sin.: *Paxillus rubicundulus* P.D. Orton] crece en el norte de Europa, sudoeste de Groenlandia y América del Norte. Familia: *Tapinellaceae*: *Tapinella panuoides* (Batsch) E.-J. Gilbert [Sin.: *Agaricus panuoides* Fr.; *Paxillus panuoides* (Fr.) Fr.; *Tapinella panuoides* f. *ionipus* (Qué.) Šutara] crece en Argentina (provincias de Buenos Aires, Río Negro y Tierra del Fuego) (7, 17) y en Europa; *Tapinella atrotomentosa* (Batsch) Šutara [Bas.: *Agaricus atrotomentosus* Batsch; *Paxillus atrotomentosus* (Batsch) Fr.] crece en Asia, América Central, Europa y América del Norte.

### **2.3. Toxisíndrome neumónico alérgico. Licoperdonosis o micetismo por *Lycoperdon perlatum* y por *Pholiota nameko*:**

Los hongos del género *Lycoperdon* (llamados “hongos polvera” en Argentina; en inglés: “puffballs”) son hongos gasteroides u hongos con forma o aspecto de estómago, que comparten una morfología similar, la forma globosa, al menos durante la fase juvenil. El desarrollo de estos hongos es angiocárpico, es decir que forman un basidiocarpo en el que el himenio o gleba (lugar donde se desarrollan las esporas) permanece encerrado por una capa externa o envoltura, llamada peridio, que mantiene a las esporas en el interior hasta alcanzar su madurez (18, 19). La dispersión de esporas ocurre a través de una abertura o desintegración del peridio, por ejemplo, en el caso de especies del género *Lycoperdon* es por medio de un orificio en la parte superior por el que salen expulsadas las esporas que tienen espinas externas microscópicas afiladas, en forma de un polvo muy fino, que al ser inhalado provoca el toxíndrome (20). Esta condición afecta a humanos en forma casual o intencional y en especial a los que trabajan en la industria y comercialización de hongos. También ocurre en perros (21-23).

Los hongos gasteroides degradan la materia orgánica, por lo que participan en el reciclaje de nutrientes (24). Las especies de *Lycoperdon* se encuentran distribuidas prácticamente en todo el mundo. Sus esporas se usan en medicina tradicional como cicatrizantes y para aliviar quemaduras, lastimaduras y picaduras. Varias especies se encuentran en toda América del Norte y gran parte de América del Sur, como Argentina, Brasil, Paraguay y otros países. Estos hongos son comestibles en su fase juvenil, tanto crudos como cocidos, de muy buen aroma y sabor, cuando la gleba es aún homogénea, carnosa y blanca como en *Lycoperdon perlatum* o en *Calvatia cyathiformis*; se los fríe y reboza, o bien reemplazan a las albóndigas en las sopas. *L. perlatum* es una de las varias especies comestibles que se venden en los mercados de los estados mejicanos, como el de Puebla (25). Se realizó un análisis filogenético molecular de la familia *Lycoperdaceae*, actualmente *Agaricaceae*, de taxones del norte europeo (19), pero no se incluyeron las especies del Hemisferio Sur, quedando por lo tanto su filogenia sin resolver (26). Otro tipo de hongo, *Pholiota nameko* de la familia *Strophariaceae* ha provocado también el toxíndrome neumónico alérgico (27).

**Sintomatología:** La progresión típica de la licoperdonosis incluye síntomas de un resfrío pocas horas después de la inhalación de las esporas, seguido de náuseas, pulso rápido, estertores crepitantes y disnea. Esos síntomas están acompañados muchas veces por fiebre, mialgia y fatiga. Los pacientes generalmente requieren internación e intubación.

Esta enfermedad respiratoria presenta síntomas de neumonía y densidades generalizadas en los pulmones y puede conducir a un diagnóstico erróneo. El curso es bastante prolongado, pero de buen pronóstico. Las radiografías de tórax de todos los pacientes con



licoperdonosis demostraron infiltración pulmonar bilateral, a menudo nodular, y las biopsias pulmonares revelaron inflamación pulmonar y estructuras compatibles con esporas de *Lycoperdon*. Todos los pacientes se recuperaron después de períodos variables de internación, generalmente con tratamiento con esteroides y/o antimicrobianos (20, 28).

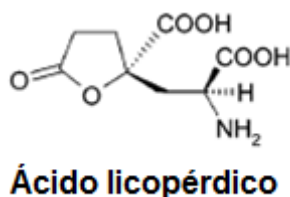
**Características de la licoperdonosis (enfermedad por inhalación de esporas):** La licoperdonosis se clasifica como una **neumonitis por hipersensibilidad** (también llamada alveolitis alérgica extrínseca) que es una inflamación de los alvéolos o broncoalveolitis causada por la inhalación repetida de antígenos específicos que se encuentran en una gran variedad de entornos (29); en este caso, las esporas naturales inhaladas. La enfermedad es rara, posiblemente debido a la gran cantidad de esporas que deben inhalarse para que se produzcan los efectos clínicos (28). Los primeros pocos casos de neumonitis por hipersensibilidad se describieron a principios del siglo XX en agricultores expuestos a heno o paja enmohecidos (30).

La reacción inflamatoria en los casos de licoperdonosis podría representar una respuesta reactiva a la presencia de un material extraño, como las esporas, o ser una reacción alérgica o una respuesta a una infección fúngica activa o a una toxina, o por último, alguna combinación de estos procesos. Por los estudios histopatológicos en pacientes, en perros y ensayos en hamsters, se sabe actualmente que las esporas fúngicas, especialmente las menores de 10 µm, se depositan ampliamente en el pulmón después de la inhalación, y en un estudio en hamsters (ver abajo, ensayos en animales) se demostró que las esporas de 3 µm de diámetro son desplazadas de una manera específica que facilita la fagocitosis por los macrófagos (31, 32). En consecuencia, se considera que la licoperdonosis representa una reacción de hipersensibilidad a las esporas y, por lo tanto, se la ha denominado con mayor frecuencia **neumonitis** (28). La neumonitis por hipersensibilidad es el resultado de una respuesta inmune exagerada, que da lugar a síntomas agudos similares a la infección o al daño pulmonar progresivo, a veces irreversible. El diagnóstico se basa en una combinación de características clínicas de la enfermedad. Los mecanismos inmunes que conducen a la neumonitis por hipersensibilidad aún no se conocen por completo. Inicialmente, se creía que era una respuesta inmune de los tipos III y IV, ahora se tiene una comprensión más clara de los complejos eventos inflamatorios involucrados. Estos incluyen la liberación de citoquinas proinflamatorias y una disminución de los mecanismos de control inmune vía las células T reguladoras, tensioactivas y dendríticas. A pesar del mayor conocimiento sobre el tema, no han cambiado el tratamiento y el resultado de la neumonitis por hipersensibilidad. Los corticosteroides orales siguen siendo los únicos medicamentos efectivos y además, evitar el contacto con el agente causante. Si no se controla, la neumonitis por hipersensibilidad puede ocasionar daño pulmonar irreversible en forma de fibrosis o enfisema, insuficiencia respiratoria e incluso la muerte (30).

La neumonitis por hipersensibilidad representa un riesgo ocupacional significativo para las personas que trabajan en empresas de cultivo, cosecha y elaboración de hongos que están crónicamente expuestos a esporas de hongos; sin embargo, la mayoría de los casos de licoperdonosis ocurrieron después de una sola inhalación grande, en lugar de exposición repetida (27, 33).

**Componentes químicos de especies de *Lycoperdon*:** En la búsqueda de algún compuesto químico que pudiera contribuir a este micetismo, se aislaron e identificaron de carpóforos de *L. perlatum*: el pigmento **melanina** (34), **ácidos grasos** como ácido linoleico (37% de los ácidos grasos totales), ácido oleico (24%), ácido palmítico (14,5%) y ácido esteárico (6,4%) (35), **ácido cinámico** (36), **esteroides** derivados del ergosterol y del lanosterol, y compuestos volátiles responsables del olor y sabor de estos hongos como **3-octanona**, **1-octen-3-ol** y **(Z)-3-octen-1-ol**(37). Los extractos presentaron **actividad antimicrobiana** alta contra las bacterias patógenas humanas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, con una actividad comparable a la del antibiótico ampicilina (38), contra *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* y *Mycobacterium smegmatis* (39) y **actividad antifúngica** contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Verticillium dahliae* (40).

El aminoácido **ácido licopérdico** (Fig. 3) [3-(5(*S*)-carboxi-2-oxotetrahidrofuran-5 (*S*)-1l)-2(*S*)-alanina] se aisló de *Lycoperdon perlatum* en 1978 (41). Debido a la similitud estructural de este aminoácido con el ácido (*S*)-glutámico, se considera que el ácido (*S*)-(+)-licopérdico presenta actividad sobre el receptor de glutamato en el sistema nervioso central de los mamíferos.



**Figura 3:** Estructura química del ácido licopérdico.

Además, *Lycoperdon perlatum* bioacumula metales pesados presentes en el suelo (42), *por lo que* puede usarse como un bioindicador de la contaminación del suelo (43). Se ha demostrado experimentalmente que la biomasa de *L. perlatum* remueve los iones mercurio de las soluciones acuosas, y se está investigando su posible uso como material biosorbente, renovable y de bajo costo en el tratamiento de agua y de aguas residuales que contienen mercurio (44).

**Historia del micetismo. Casos clínicos:** La enfermedad fue descrita por primera vez en la literatura médica en 1967, cuando se registraron los dos primeros casos de un niño y de un adolescente que inhalaban intencionalmente las esporas como tratamiento de epistaxis (hemorragia nasal) (45). Con el mismo fin, en 1976, un niño de 4 años desarrolló la enfermedad en Noruega después de inhalar deliberadamente una gran cantidad de esporas (46). En 1994, se registraron 8 casos de adolescentes, entre 16 y 19 años, del sureste de Wisconsin que inhalaban esporas de *Lycoperdon perlatum* en una fiesta y presentaron síntomas clínicos como tos, fiebre, respiración corta, mialgia y fatiga. Cinco de los ocho requirieron internación y dos fueron intubados para ayudar a la respiración (20). En 1997 se registraron varios casos de adolescentes que inhalaban esporas. En un caso grave, el paciente inhaló suficientes esporas como para poder expulsarlas por su boca; se sometió a una broncoscopia y tuvo que recibir soporte vital antes de recuperarse en unas cuatro semanas. En otro caso, un adolescente pasó 18 días en coma, le extirparon porciones de su pulmón y sufrió daño hepático grave (28). Se registraron varios casos de origen ocupacional, aunque no todos debidos a especies del género *Lycoperdon*. Así por ejemplo, se demostró neumonitis por hipersensibilidad debida a la inhalación de esporas del hongo comestible *Pholiota nameko* (27). Un trabajador de una empresa de hongos de 52 años sufrió tos, disnea de esfuerzo y fiebre alta varias horas después de trabajar en la sala de cultivo de estos hongos. Su examen reveló crepitaciones basales bilaterales, sombras granulares finas en ambos campos pulmonares de la radiografía de tórax y una ligera disminución en la capacidad de difusión. Se encontraron factores de inhibición de la migración de macrófagos y precipitina contra el extracto de esporas del hongo y no con otros contaminantes y mohos. El hallazgo histológico por biopsia pulmonar transbronquial mostró alveolitis granulomatosa. Se encontró un aumento manifiesto de linfocitos en su fluido de lavado broncoalveolar. El test de inhalación provocativa con el extracto reveló síntomas y signos similares en su lugar de trabajo ocho horas después de la inhalación (27).

**Casos en animales:** La licoperdonosis también ocurre en perros; en los pocos casos reportados, los animales habían estado jugando o cavando en áreas con *Lycoperdon pyriforme* (21-23). El diagnóstico se basó en la historia del perro jugando en un lecho de estos hongos y en la presencia de estructuras vacuoladas dentro de un aspirado transtraqueal. En el año 2010, se describieron la progresión clínica y la histopatología de dos casos confirmados de licoperdonosis canina mortal en EE.UU. (22). En el examen histológico, los bronquiolos y las grandes regiones del intersticio alveolar adyacente de ambos perros estaban gravemente infiltrados por numerosos macrófagos. A lo largo de todas las secciones, los macrófagos ocasionalmente contenían dentro de su citoplasma 1-3

esporas redondas de 3-5 µm de diámetro, las cuales se tiñeron fuertemente tanto con plata-metamina de Gomori como con ácido periódico-Schiff. Por la morfología de las esporas y por el análisis genético a partir de un fragmento de ADN se pudo determinar que eran esporas de *Lycoperdon pyriforme* (18).

**Ensayos en animales:** Las respuestas biológicas a las esporas fúngicas inhaladas transportadas en el aire, que son portadoras de alérgenos, se entenderían mejor si se tuviera una idea de su patrón de distribución e interacción con las estructuras pulmonares. Por lo tanto, se hicieron ensayos en hamsters intubados y anestesiados que inhalaban aerosoles de esporas de *Calvatia excipuliformis*, de diámetro: 3,1 micrometros (µm), ya sea por respiración espontánea (grupo A, *n* = 3) o mediante ventilación continua con presión negativa (grupo B, *n* = 4). Los pulmones se fijaron mediante perfusión intravascular de solución de fijación dentro de los 29 minutos de la inhalación inicial y las muestras de tejido se procesaron luego para microscopio óptico y electrónico (31).

El análisis estereológico del tejido pulmonar reveló que el mayor número de esporas se depositaron dentro de los alvéolos (67,2% en el grupo A y 89,8% en el grupo B). Las vías respiratorias conductoras intrapulmonares conservaron una proporción intermedia (32,3% en el grupo A y 10,0% en el grupo B), mientras que los bronquios y la tráquea tuvieron la proporción más baja (0,5% o menos). Las esporas depositadas se alojaron dentro de la capa acuosa de revestimiento y muy cerca de las células epiteliales. En las vías respiratorias conductoras intrapulmonares, el 22,3% de las esporas en el grupo A y el 9,0% de las del grupo B fueron captadas por macrófagos (31). Así se demostró que las basidiosporas inhaladas, de 3 µm de diámetro, se distribuyen en una gran área superficial y además se desplazan hacia la capa acuosa de revestimiento de las vías respiratorias y los alvéolos, con lo cual se facilita la fagocitosis subsiguiente por los macrófagos. Esta interacción de las esporas con las estructuras pulmonares es importante en el desarrollo de alergias respiratorias inducidas por alérgenos fúngicos transportados por el aire. Los subsiguientes experimentos confirmaron estos resultados (32).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Agaricaceae*; *Lycoperdon perlatum* Pers. ("**hongo polvera**", "caja de rapé del diablo", en inglés: "puffball") [**Sin.:** *Lycoperdon gemmatum* Batsch, *L. gemmatum* var. *perlatum* (Pers.) Fr., *L. bonordenii* Masee, *L. perlatum* var. *bonordenii* (Masee) Perdeck] es una especie sapróbica, que crece solitaria, dispersa o en grupos en el suelo, en bosques, áreas verdes y caminos; también puede crecer en anillos de hadas, es cosmopolita (47), desde África (Kenia, Ruanda, Tanzania), Asia [China, Himalaya, Japón (48), sur de la India (49)], Oceanía [Nueva Zelanda y Australia], Europa (19), América del Norte [desde Alaska hasta Méjico (50)] y América del Sur (Paraguay, Brasil (51) y Argentina (52)). Se ha recolectado en las zonas subárticas de Groenlandia y de las regiones subalpinas de Islandia (53). La especie es popular en las estampillas (sellos postales) y ha sido representada en estampillas de Guinea, Paraguay, Rumania, Sierra Leona y Suecia (54); *Apioperdon pyriforme* (Schaeff.) Vizzini & Ercole según estudios moleculares recientes (55) [**Bas.:** *Lycoperdon pyriforme* Schaeff.; **sin.:** *Morganella pyriforme* (Schaeff.) Kriese & D. Krüger] especie de distribución mundial, crece en Argentina (provincias de Misiones (56, 57), Córdoba (58) y Catamarca); los basidiomas se desarrollan sobre madera muerta en lugares sombríos (59, 60); *Calvatia fragilis* (Vittad.) Morgan [**Bas.:** *Lycoperdon fragile* Vittad.; **sin.:** *Utraria fragilis* (Vittad.) Quél., *Calvatia cyathiformis* subsp. *fragilis* (Vittad.) Dring, *C. cyathiformis* f. *fragilis* (Vittad.) A.H. Sm., *Bovista amethystina* Cooke & Masee, *B. cinerea* Ellis, *B. dealbata* Berk. ex Masee] crece en la provincia de Catamarca, Argentina (60); *Calvatia gigantea* (Batsch ex Pers.) Lloyd (nombre común en inglés: "giant puffball") [**Sin.:** *Langermannia gigantea* (Batsch ex Pers.) Rostk.] se encuentra en áreas templadas de todo el mundo. Familia: *Strophariaceae*; *Pholiota nameko* (T. Itô) S. Ito & S. [**Bas.:** *Collybia nameko* T. Itô; **sin.:** *Kuehneromyces nameko* (T. Itô) S. Ito] crece en China, Japón y Rusia (27).

**2.4. Toxíndrome panterínico o neurotóxico glutaminérgico. Micetismo por compuestos isoxazólicos o síndrome pantherinal muscaria:**

Este micetismo se debe a las especies *Amanita pantherina* y *Amanita muscaria*, por eso a veces se lo denomina síndrome *pantherinalmuscaria*. También producen este síndrome otras especies de *Amanita* como: *A. gemmata* y *A. regalis*.

**Período de latencia:** Corto, de 30 minutos a 2 horas después de la ingestión.

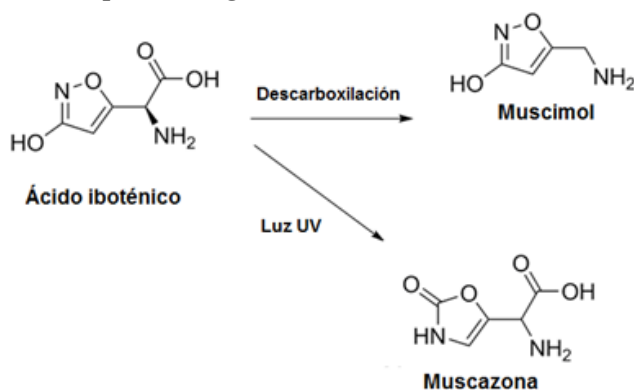
**Síntomatología:** Este micetismo se caracteriza por acción sobre el sistema nervioso central. Los síntomas de los compuestos isoxazólicos (ácido iboténico y muscimol) aparecen con bastante rapidez y pueden incluir náuseas, vómitos y dolores abdominales, pero afectan principalmente al sistema nervioso central. Suelen ser muy variables, debido no sólo a la cantidad ingerida de carpóforos, sino también a la reacción individual del consumidor, a la presencia de otras sustancias bioactivas no psicotrópicas en los carpóforos, a las zonas de recolección y variedades fúngicas (61). Los síntomas se pueden prolongar hasta 6 a 8 horas después de la ingestión, según la dosis ingerida. Algunas personas han tenido dolores de cabeza hasta 10 horas después.

Los síntomas neurológicos típicos son desorden mental, euforia, dificultad de coordinación y de habla, ataxia, estado de embriaguez, agresividad, alucinaciones y confusión mental (9, 62). Son frecuentes los trastornos motrices como: vértigos, ataxia, incoordinación, agitación, trastornos de la visión, midriasis y, en ocasiones, enrojecimiento de la piel y taquicardia.

Según los compuestos presentes: Sensación de embriaguez, alteraciones visuales y auditivas de la percepción, disociación (separación del cuerpo y la mente), somnolencia, estado comatoso (muscimol); o hiperactividad, sacudidas miotónicas, agitación, confusión, delirios y alucinaciones (ácido iboténico) (62). El ácido iboténico evoca efectos enteógenos en el ser humano; el pico de la intoxicación es alcanzado aproximadamente entre dos y tres horas después de la ingestión. *A. muscaria* contiene más ácido iboténico excitador y menos muscimol depresivo en comparación con *A. pantherina*; por lo tanto, los pacientes presentan cuadros clínicos diferentes, como los descritos, y se considera entonces que el llamado síndrome iboténico o síndrome *pantherinalmuscaria* podría dividirse en dos subtipos (63).

La intoxicación por grandes dosis puede llegar a ser mortal. Normalmente, las alteraciones no duran más de un día y acaban con un sueño profundo más o menos reparador de 10 a 15 horas, al final del cual el paciente no recuerda lo sucedido. Al despertar, la persona intoxicada generalmente tiene la sensación de reencarnación; siente dolor de cabeza, debilidad y se encuentra en estado depresivo. Los trastornos de la coordinación de movimiento, habla y visión a veces persisten durante varios días. La causa más común de muerte es insuficiencia cardíaca y paro respiratorio. La intoxicación aleatoria con *A. muscaria* termina en muerte en sólo el 2-5% de los casos. Los niños y los ancianos son la población de riesgo (61).

Recientemente se realizó una revisión retrospectiva de este micetismo en un centro regional de intoxicaciones de los Estados Unidos desde 2002-2016 (64). La intoxicación por ingestión de *A. pantherina* presenta mayor cantidad de síntomas que la de *A. muscaria*, es de mayor gravedad y, aunque rara vez, puede llegar a ser mortal.



**Figura 4:** Estructuras químicas de ácido iboténico, muscimol y muscazona.

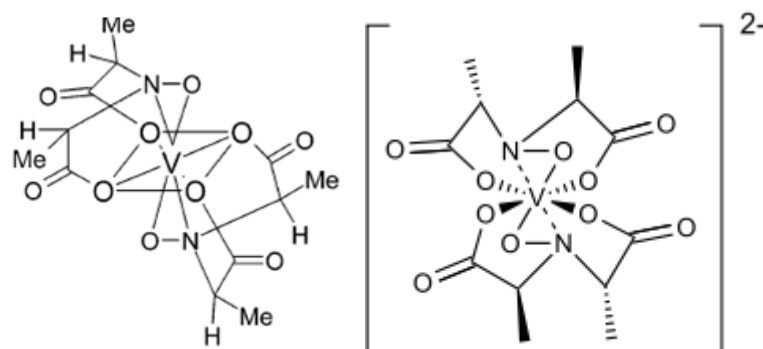
**Toxinas:** Las sustancias responsables de la intoxicación son los isoxazoles psicoactivos: **ácido iboténico**, **muscimol**(el más potente) y **muscazona** (Fig. 4).

Muscimol (5-aminometil-3-hidroxiisoxazol; llamado antiguamente **panterina**) es un componente del atractivo hongo psicotrópico *Amanita muscaria* (“hongo de los enanitos”; sombrero rojo con “pintas” blancas) que ha sido objeto de considerable interés farmacológico y de síntesis orgánica de derivados y análogos (65).

Muscazona es un aminoácido tóxico presente en *A. muscaria* europea, que se considera que proviene de la reacción fotoquímica del ácido iboténico y que se produce durante el aislamiento (61). El ácido iboténico y muscimol se encontraron en *A. cothurnata*, *A. muscaria*, *A. pantherina* y en concentraciones más bajas en *A. gemmata* (62, 66). *Amanita muscaria*, a pesar de ser una especie tóxica, se ha utilizado en diversas culturas desde la antigüedad asociada con el misticismo por sus propiedades alucinogénicas, con una historia que data de al menos el siglo XIII y que aún hoy es objeto de investigaciones por los cambios perceptuales, conductuales, emocionales y volitivos producidos por su ingestión (61, 65, 67).

*A. muscaria* contiene altos niveles de ácido iboténico, que es tóxico si se ingiere y cuando los carpóforos se secan, se descarboxila para dar el compuesto psicoactivo muscimol (68).

También si el hongo se expone a la luz ultravioleta el ácido iboténico se convierte en muscazona, que es además un bioacumulador del metal pesado **vanadio**, llegando a niveles de vanadio de hasta 400 veces mayores que los encontrados en plantas (69). Si bien aún se está estudiando la importancia biológica de la bioacumulación, la naturaleza nociva de los metales pesados por ingestión, es bien conocida. Pero además las especies de *Amanita* contienen un complejo azul pálido de vanadio que es **amavadina**, que contiene un ión vanadio (IV) (coordinación ocho) y dos moléculas de *N*-(1-carboxietil)-*N*-hidroxialanina; se aisló por primera vez de extractos acuosos de *A. muscaria* y su estructura revisada se muestra en la Fig. 5.

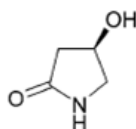


**Figura 5:** Estructura química del complejo amavadina.

Amavadina se encuentra en tres especies de hongos tóxicos del género *Amanita*: *A. muscaria*, *A. regalis* y *A. velatipes*. La función biológica de amavadina aún se desconoce, si bien se cree que utiliza peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y actúa como una peroxidasa para ayudar a la regeneración de los tejidos dañados (70). En el hongo, amavadina puede servir como una toxina para la protección del carpóforo (69).

*A. muscaria* también tiene la capacidad de acumular cationes del suelo en los carpóforos (71), como **altas concentraciones de Cd, Cu, Hg y Mn en los sombreros**, pero depende fuertemente de su cantidad en el suelo o sustrato sobre el que está creciendo (72). Recientemente, se estudió el contenido de cationes geogénicos en la capa superior del suelo en regiones de Polonia, demostrando que en todos los casos *A. muscaria* pudo regular la captación y acumulación de Ag, Al, Ba, Ca, K, Mg, Na, Rb y Zn, que tenían niveles de concentración similares en los sombreros, pero no necesariamente en los estípites (71).

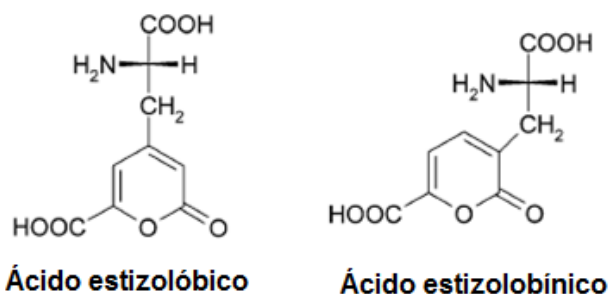
*Amanita muscaria* y *A. pantherina* contienen además una serie de aminoácidos no proteicos. En *A. muscaria* se encontró **(-)-(R)-4-hidroxi pirrolidona-2** (Fig. 6), cuya estructura está muy relacionada con las del ácido iboténico y de muscimol (73).



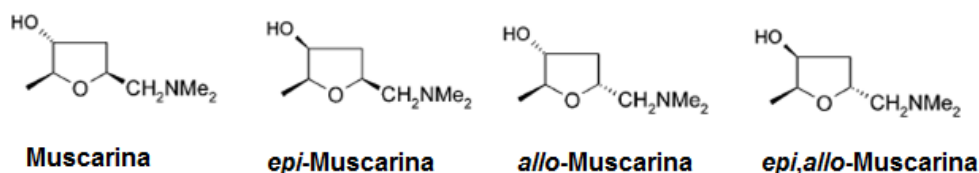
**(-)-(R)-4-Hidroxi-pirrolidona-2**

**Figura 6:** Estructura química de (-)-(R)-4-hidroxi-pirrolidona-2.

Los **ácidos estizolóbico** y **estizolobínico** (Fig. 7) son aminoácidos 2-oxo-piranos no proteínogénicos bioactivos que se han encontrado en *Amanita pantherina* y en niveles bajos en *A. gemmata* y *A. muscaria* (66).



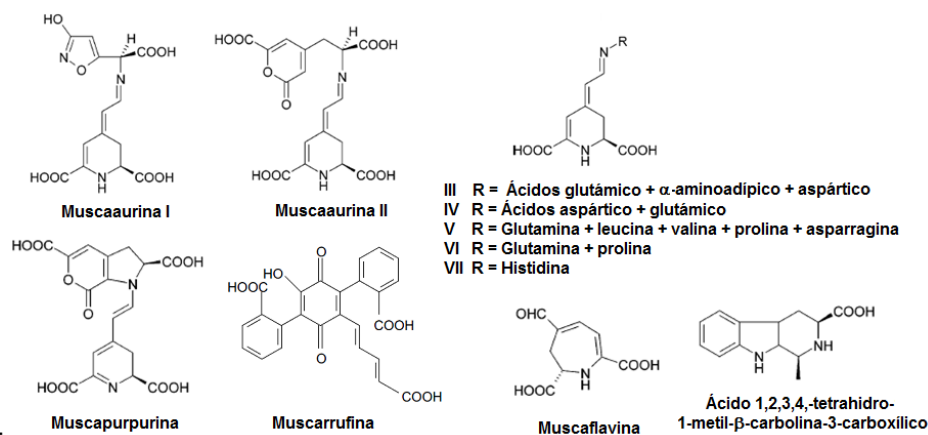
**Figura 7:** Estructuras químicas del ácido estizolóbico y del ácido estizolobínico.



**Figura 8:** Estructuras químicas de muscarina, *epi*-muscarina, *allo*-muscarina y *epi,allo*-muscarina.

Muscarina es un compuesto quiral que existe en ocho estereoisómeros. Justamente, **muscarina**, ***epi*-muscarina** y ***allo*-muscarina** (Fig. 8) se han detectado en el micelio de *A. muscaria* (74). No se demostró inequívocamente la presencia de ***epi,allo*-muscarina** (65). El renovado interés en esta molécula se debe, en parte, a que varios subtipos de receptores muscarínicos parecen estar implicados en la enfermedad de Alzheimer (73). Se debe tener en cuenta que es la primera sustancia parasimpaticomimética que fuera estudiada; causa una profunda activación parasimpática que puede terminar en convulsiones y muerte. Pero, en *Amanita muscaria* se encuentran sólo ínfimas cantidades de muscarina (0,0002-0,0003%) en comparación con las encontradas en algunas especies de *Inocybe* (0,43%) y de *Clitocybe* (0,15%) (ver sección 2.2). Debido a las trazas en los carpóforos, *A. pantherina* y *A. muscaria* no podrían inducir un síndrome muscarínico sin un consumo excesivo (65). También hay otras sustancias de amonio cuaternario en *A. muscaria* (colina, acetilcolina, betaína, hercinina, sal de buteniltrimetil-amonio), pero sólo en trazas, por lo que su contribución a los efectos biológicos de *A. muscaria* es aparentemente insignificante (74). *A. muscaria* contiene una mezcla de pigmentos (75): el principal es el derivado de terfenilquinona **muscarrufina** (Fig. 9) (color amarillo) (76); los pigmentos **muscaaurinas I-VII** (Fig. 9) son **betalainas** responsables del característico color rojo-anaranjado de los sombreros de varias especies de *Amanita* (65); **muscaflavina** (Fig. 9) (pigmento amarillo, antibiótico y antifúngico natural (61), **muscapurpurina** (Fig. 9) (pigmento púrpura; estructura relacionada con muscaaurinas) (65, 75). También se encontró una **tetrahidro-β-carbolina** bioactiva como el **ácido 1,2,3,4-tetrahidro-1-metil-β-carbolina-3-carboxílico** (Fig. 9) (65).





**Figura 9:** Estructuras químicas de muscaaurinas I-VII, muscapurpurina, muscarrufina, muscaflavina y ácido 1,2,3,4-tetrahidro-1-metil-β-carbolina-3-carboxílico.

**Mecanismo de acción:** Los compuestos isoxazólicos, ácido iboténico y muscimol, son los componentes biológicamente activos más importantes, pero otros principios activos contribuyen a la bioactividad observada en este micetismo.

El **ácido iboténico** o **ibotenato** es un análogo conformacionalmente restringido del glutamato (ácido glutámico) que es el neurotransmisor excitador más abundante en los vertebrados. Debido a esa similitud estructural el ácido iboténico actúa como un agonista no selectivo de los receptores de glutamato, específicamente en los sitios del receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) en el sistema nervioso central (77). Justamente la toxicidad del ácido iboténico proviene de la activación de los receptores NMDA; es por eso que es un fuerte excitador neuronal (78) y una poderosa neurotoxina (79), aunque unas cinco veces menos potente que el ácido kaínico en causar la degeneración de los cuerpos celulares neuronales del hipocampo.

El ácido iboténico actúa como un potente agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato NMDA y del grupo I (mGluR1 y mGluR5) y II (mGluR2 y mGluR3) (77); es inactivo en los mGluRs del grupo III. El ácido iboténico también actúa como un agonista débil de los receptores de AMPA y kainato (77).

Los receptores NMDA están relacionados con la plasticidad sináptica y trabajan con los receptores metabotrópicos de glutamato para establecer la potenciación a largo plazo, que se cree que está relacionada con la adquisición de información. Como el ácido iboténico es un potente agonista del receptor NMDA, lo activa al unirse al mismo, permitiendo así un influjo excesivo de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el sistema, causando entonces lesiones graves e incluso la muerte neuronal. Los iones calcio también activan a CaM-KII o  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina quinasa que fosforila múltiples enzimas. Las enzimas activadas luego comienzan a producir especies reactivas de oxígeno que dañan el tejido circundante. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  causa el aumento del sistema de transporte de electrones mitocondrial, lo cual aumentará aún más el número de especies reactivas de oxígeno (80).

Debido a que el ácido iboténico se dirige a estos sistemas, los síntomas asociados con esta intoxicación se relacionan con la percepción y el control, por lo que provoca distorsiones visuales, espaciales y auditivas, hiperactividad, sacudidas miotónicas, convulsiones y amnesia retrógrada (63).

El ácido iboténico se emplea como un "agente de lesión cerebral" mediante inyecciones intracraneales en investigación científica (79). La administración estereotáxica intrahipocámpica de ácido iboténico en ratas perjudica la transmisión colinérgica, el desempeño del aprendizaje y de la memoria, lo cual está relacionado con la enfermedad de Alzheimer, por lo que es un modelo adecuado para ensayar la eficacia de fármacos para esa enfermedad. Dado que el ácido iboténico es un agonista del glutamato, se espera que presente un efecto excitotóxico por alterar los receptores glutamatérgicos, como el receptor NMDA (78). Un estudio reciente (81) también mostró alteraciones significativas en la

expresión de ARNm de las subunidades NR2A y NR2B de los receptores NMDA, y que los receptores colinérgicos disminuyeron en la expresión particularmente de  $\alpha 7$ -nAChR con m1AChR incrementado.

**Muscimoles** el isoxazol psicoactivo más importante de *A. pantherina* y *A. muscaria* que causa sedación y delirio. Es un análogo estructural del neurotransmisor inhibitor ácido  $\gamma$  aminobutírico (GABA), debido a lo cual es un potente agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>A-p</sub> (conocidos antes como GABA<sub>C</sub>; tienen alta expresión en la retina) (82). Al ser potente agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> muscimol causa incoordinación, sensación de embriaguez, mareos y somnolencia simulando un coma que puede durar 24 horas. Pero generalmente se produce una recuperación total con el tiempo.

Los receptores GABA<sub>A</sub> se encuentran en la membrana de sus neuronas postsinápticas, si bien algunas isoformas se pueden encontrar extrasinápticamente. El muscimol puede activar a los receptores tanto postsinápticos como extrasinápticos de GABA<sub>A</sub> (83). Cuando se administra **muscimol**, éste es particularmente activo en el cerebro, corteza cerebral y en el hipocampo. *Amanita muscaria* y *Amanita pantherina* por la acción del ácido iboténico y muscimol se usan asiduamente en determinados ritos chamánicos, como sacramento, en Méjico, Guatemala y en Rusia (Siberia), entre otros países. Al ser ingerido, el ácido iboténico se convierte en parte en muscimol que se excreta prácticamente inalterado por orina, de allí la práctica de beber la orina de los chamanes por parte de los asistentes a los ritos. La orina tendría el mismo efecto que *A. muscaria*, sin los efectos negativos de náuseas y vómitos provocados por la muscarina, que no se encuentra en la orina ya que se metaboliza en el organismo (61).

**Muscazona** es un aminoácido tóxico que en investigaciones farmacológicas resultó ser menos activo que el ácido iboténico o el muscimol. Su consumo causa lesiones visuales, confusión mental y pérdida de memoria. En los pacientes, la mayor parte del ácido iboténico ingerido se excreta sin cambios en orina, con sólo una fracción que se metaboliza a muscimol, que es 5-10 veces más potente (84). Los dos aminoácidos no proteínogénicos 2-oxo-piranos, **ácido estizolóbico** y **ácido estizolobínico** (66), son aminoácidos excitadores en las neuronas centrales de los mamíferos que se unen preferiblemente a otros receptores distintos del receptor de tipo NMDA; así, han presentado acción excitadora en la médula espinal aislada de rata (73, 85). Ambos aminoácidos son antagonistas competitivos del receptor tipo quisqualato en la unión neuromuscular del cangrejo de río, por lo que disminuyeron las respuestas al glutamato y quisqualato de manera competitiva en esa unión, sin afectar las respuestas a GABA (86). El ácido estizolobínico fue aproximadamente 5 veces menos potente que el ácido estizolóbico (85, 86).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Amanitaceae*: ***Amanita muscaria*** (L.) Lam. [*Bas.: Agaricus muscarius* L.] crece en las regiones templadas y boreales del hemisferio norte, pero también en América del Sur, en Brasil (87) y en Argentina (provincias de Mendoza, Córdoba, Buenos Aires y Andes patagónicos argentinos) (7, 9, 88) en todas sus variedades; ***Amanita pantherina*** Gonn. & Rabenh. (sección *Amanita*) se encuentra en Argentina (en Cariló, Partido de Pinamar, Provincia de Buenos Aires) entre pinocha, en bosque implantado de *Pinus maritimus* y en distintas áreas del Continente Americano, como Méjico (89), EE.UU. y Uruguay, así como en el continente europeo (90). En Europa, *A. pantherina* fue encontrada asociada con distintas especies de *Quercus*, *Pinus* y *Castanea sativa*, entre otras (91), mientras que en EE.UU. sólo fue encontrada asociada con especies de *Pinus*. Existe una importante cantidad de variedades y formas de *A. pantherina*; ***Amanita gemmata*** (Fr.) Bertill. [*Bas.: Agaricus gemmatus* Fr.] (sección *Amanita*) crece en el hemisferio norte y en América del Sur, en Buenos Aires y en el Sur de Argentina, en bosque implantado de *Pinus maritimus* (88, 92); ***Amanita regalis*** (Fr.) Michael [*Bas.: Agaricus muscarius*  $\beta$  *regalis* Fr.; sin.: *Agaricus muscarius* var. *umbrinus* (Pers.) Fr.; *Amanita muscaria* var. *regalis* (Fr.) Sacc.; *A. emilii* Riel; *A. umbrina* Pers.] crece en los países escandinavos, noreste de Europa y en Alaska, principalmente; ***A. velatipes*** G. F. Alk. crece en el este de América del Norte; ***A.***



*cothurnata* G. F. Atk. [Sin.: *Venenarius cothurnensis* (G.F. Atk.) Murrill] crece en América del Norte.

## **2.5. Toxíndrome coprínico o cardiovascular. Micetismo inducido por alcohol o reacción tipo disulfiram:**

Las dos especies más importantes que causan este micetismo son *Ampulloclitocybe clavipes* y *Coprinopsis atramentaria*, pero hay otras especies sospechosas, como *Coprinus comatus* (“sombbrero lanudo de tinta”, o en inglés: “shaggy inkcap”, “lawyer’s wig”) (93, 94).

*Coprinopsis atramentaria* (“sombbrero común de tinta”, o en inglés: “common inkcap”) no es un hongo comestible, si bien fue considerado comestible y algunos autores aún hoy así lo registran, siempre y cuando no haya consumo concomitante de alcohol (95); lo mismo ocurre con *Coprinus comatus*. Han ocurrido varias intoxicaciones después del consumo de los carpóforos combinados con la ingesta de bebidas alcohólicas.

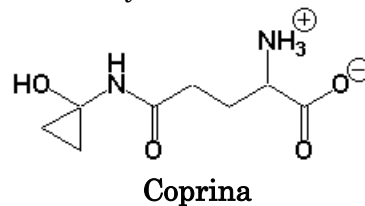
**Período de latencia:** Por lo general a los treinta minutos de la ingestión. El micetismo es inducido por el consumo de alcohol. Sin embargo, los primeros síntomas pueden aparecer dentro de los 15 minutos a 2 horas después de la ingestión; generalmente 3-6 horas después de la exposición combinada, pero la sensibilidad al alcohol puede persistir 2-3 días después del consumo de los carpóforos.

**Síntomatología:** Los síntomas duran cerca de dos horas, con recuperación completa y pueden repetirse siempre que se tomen bebidas alcohólicas durante unos días. Los síntomas típicos son: rubefacción de cara, cuello, tronco y extremidades, sofocones, dolor de cabeza, palpitaciones, náuseas y vómitos, dolor de pecho, disnea. También se presentan de manera variable, sabor metálico, diarrea, sudoración, taquicardia, arritmias cardíacas, hipotensión, vértigos y alteraciones visuales. En casos muy raros se pueden llegar a producir lesiones hepáticas o renales. La gravedad de los síntomas depende de la cantidad consumida de carpóforos y alcohol, así como del tiempo entre estas ingestas. Los síntomas también se presentan si el alcohol fue consumido con una anterioridad de cuatro horas a la comida, o si su consumo es posterior (incluso hasta cuatro días después). Según el grado de alcohol ingerido, los síntomas pueden ser muy leves o no llegar a producirse. Las intoxicaciones más graves, o más alarmantes, se refieren a *Coprinopsis atramentaria* (96), el resto de las especies únicamente producen molestias y vómitos, como es el caso de *Coprinus comatus* que causa trastornos gastrointestinales y escalofríos media hora a 8 horas después del consumo de los carpóforos (97).

Además, en pruebas cutáneas se han registrado casos de reacciones alérgicas por el contacto con extractos de tejidos de estos hongos (98, 99).

**Toxina:** La sustancia responsable de este micetismo es **coprina** (Fig. 10), que fue aislada e identificada como el agente causal en 1975 por dos grupos de investigación que acordaron darle ese nombre (100, 101) y su estructura se confirmó por síntesis (102).

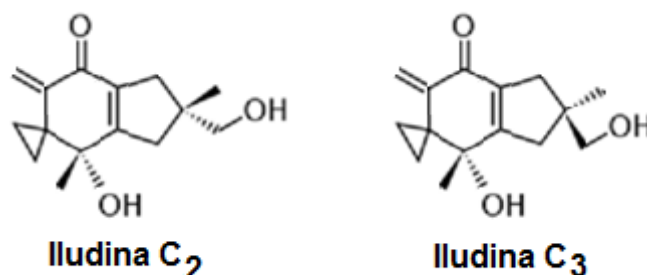
Los carpóforos de *Coprinopsis atramentaria* contienen un rango de coprina de 160-360 mg/kg de carpóforos frescos, siendo mayor la cantidad en los carpóforos viejos y la mitad en los jóvenes (102, 103). Coprina puede también estar presente en menores cantidades, ~10-15 mg/kg hasta 26 mg/kg de peso fresco, como en *Coprinus comatus* (96, 103). La presencia de coprina fue confirmada por espectrometría de masa (93). Coprina (Fig. 10) es un aminoácido no proteico con una estructura inusual, pues contiene un anillo de ciclopropano, y es relativamente estable pues no se destruye durante la cocción de los carpóforos.



**Figura 10:** Estructura química de coprina.

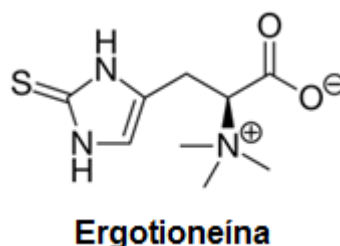
Esta intoxicación producida por coprina también se denomina de tipo “Antabus” (este medicamento tiene disulfiram como fármaco contra el alcoholismo), porque los síntomas son

parecidos a los provocados por este medicamento. También se aislaron dos iludinas, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> (Fig. 11), de cultivos de *Coprinopsis atramentaria*, con efectos antimicrobianos *in vitro* (104). Las iludinas C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> son muy similares a iludina S que es responsable de las intoxicaciones por consumir *Omphalotus olearius* (ver sección 2.1 del presente trabajo), particularmente en el centro y sur de Europa (14). No se conoce la toxicidad de las iludinas C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>.



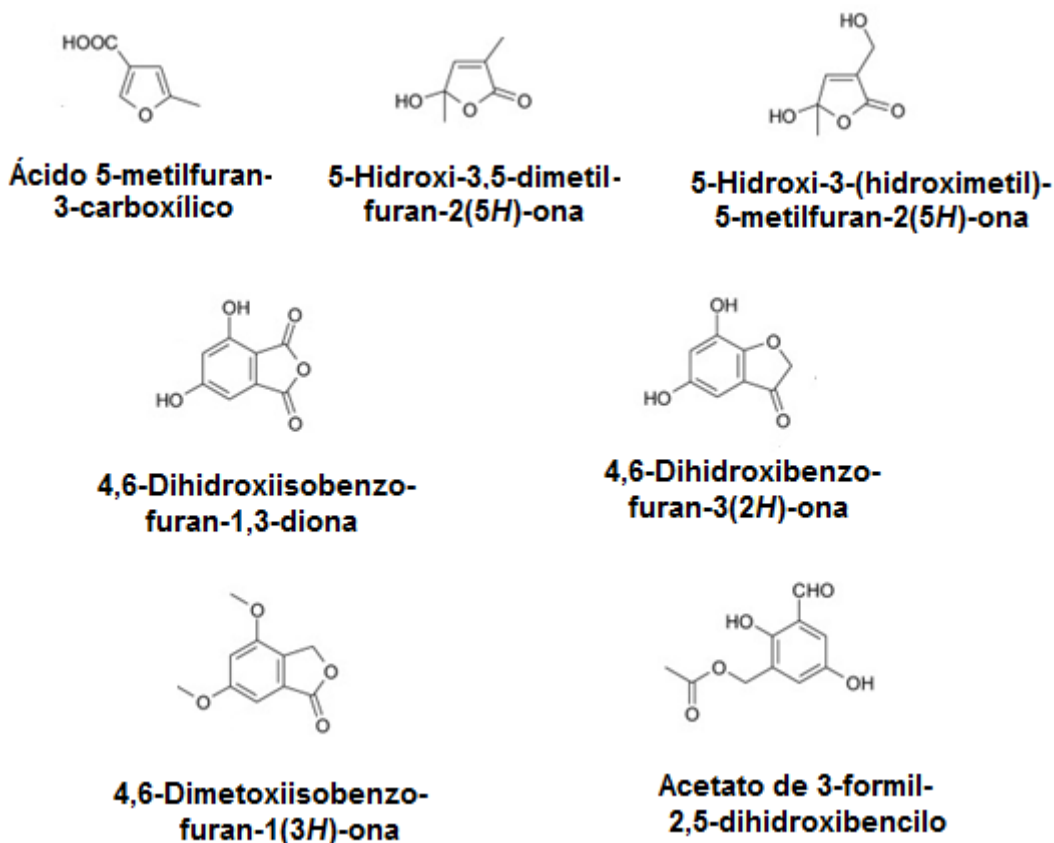
**Figura 11:** Estructuras químicas de iludina C<sub>2</sub> e iludina C<sub>3</sub>.

En carpóforos de *Coprinus comatus*, además de coprina, se identificaron otros compuestos bioactivos, como melaninas, estatinas, furanos y furanonas nematocidas y **ergotioneína** (Fig. 12) (105). También se demostró **actividad de lectina** en eritrocitos de conejo, pero no se caracterizó a la lectina con respecto a la capacidad de unión, estabilidad o masa molecular (106).



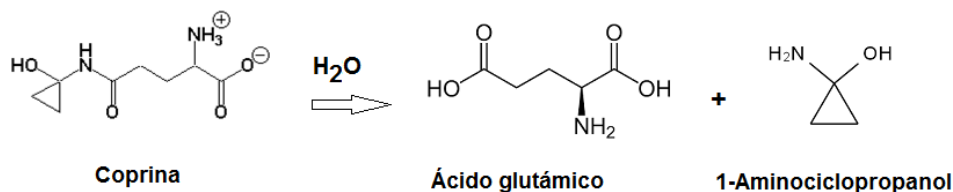
**Figura 12:** Estructura química de ergotioneína.

*C. comatus* es un hongo nematófago que forma esferas espinosas en las hifas vegetativas, que aumentan su actividad nematocida al dañar mecánicamente la cutícula del nematodo, lo que causa la pérdida del fluido pseudocoelómico (107). La infección fúngica de los nematodos ocurre sólo después de que los nematodos son inmovilizados por toxinas del hongo; un nematodo infectado es digerido y consumido en cuestión de días y las hifas crecen en el nematodo. Se aislaron seis **furanos y furanonas nematocidas** en micelios cultivados de *C. comatus* (107, 108) que inmovilizan a los nematodos: ácido 5-metilfuran-3-carboxílico, 5-hidroxi-3,5-dimetil-furan-2(5*H*)-ona, 5-hidroxi-3-(hidroximetil)-5-metilfuran-2(5*H*)-ona, 4,6-dihidroxiisobenzofuran-1,3-diona, 4,6-dihidroxibenzofuran-3(2*H*)-ona, 4,6-dimetoxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona y acetato de 3-formil-2,5-dihidroxibencilo (Fig. 13). Los dos primeros mostraron la actividad nematocida más potente (107).



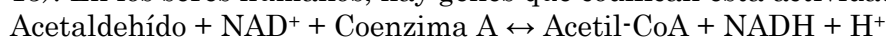
**Figura 13:** Estructuras químicas de furocompuestos, furanonas y derivados que inmovilizan nematodos.

**Mecanismo de acción de la coprina:** La coprina se metaboliza en ácido glutámico y 1-aminociclopropanol (Fig. 14), que es la sustancia biológicamente activa que inhibe a la enzima acetaldehído-deshidrogenasa que participa en el metabolismo oxidativo del alcohol (109).



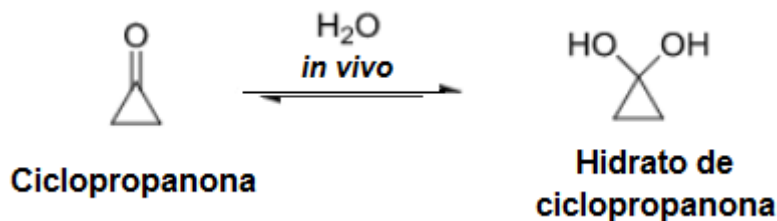
**Figura 14:** Metabolismo de coprina.

Las enzimas acetaldehído-deshidrogenasas (*EC* 1.2.1.10) catalizan la oxidación de acetaldehído a ácido acético que en presencia de Coenzima A (CoA) forma acetil-CoA (Fig. 15). En los seres humanos, hay genes que codifican esta actividad enzimática.



**Figura 15:** Reacción de oxidación de acetaldehído a ácido acético catalizada por acetaldehído-deshidrogenasa.

Por hidrólisis de coprina se forma **hidrato de ciclopropanona** (Fig. 16), además de **1-aminociclopropanol**. Ambos compuestos han demostrado actividad *in vitro* e *in vivo*. El metabolismo adicional puede producir metabolitos muy reactivos que pueden reaccionar con un grupo tiol de la deshidrogenasa y bloquear la enzima, aumentando la concentración de acetaldehído en sangre. Esto puede explicar muchos de los síntomas de intoxicación aguda observados después del consumo de *Coprinospora atramentaria* junto con bebidas alcohólicas (96, 110).



**Figura 16:** Estructura química del hidrato de ciclopropanona.

Cuando esta enzima es bloqueada, se acumula acetaldehído en sangre, causando una condición similar a la que sufren los asiáticos orientales (chinos, japoneses y coreanos) por variaciones de los genes que codifican las dos enzimas de metabolización del alcohol, alcohol-deshidrogenasa y acetaldehído-deshidrogenasa, que es la “reacción de arrebatos por alcohol”, llamada en inglés “*alcohol flush reaction*” (111). La persona desarrolla arrebatos o sofocos, eritema en la cara, el cuello, los hombros y, en algunos casos, en todo el cuerpo después de consumir bebidas alcohólicas. La reacción es el resultado de una acumulación de acetaldehído, que es un subproducto metabólico del catabolismo del etanol y es causada por una deficiencia o mal funcionamiento de las enzimas deshidrogenasas mencionadas.

**Ensayos de coprina en animales:** Se demostró que los animales de experimentación, como ratas y ratones, después de la ingesta combinada de etanol y *Coprinosis atramentaria* alcanzaron un nivel elevado de acetaldehído en sangre, con algunos de los mismos síntomas registrados en humanos, como caras hinchadas, lagrimeo y disminución de la presión sanguínea en ratas (100-102). Estudios con coprina administrada por vía oral en diferentes dosis en combinación con etanol (inyección intraperitoneal) y con diferentes intervalos de tiempo demostraron el bloqueo de la enzima acetaldehído-deshidrogenasa, causando diferentes niveles de acetaldehído en sangre (102). En un estudio de 14 días de toxicidad oral en dosis repetidas en ratas macho se aplicaron dosis de 20 y 200 mg de coprina por kg de peso corporal (20 y 200 mg/kg) (112). A la dosis de 200 mg/kg, coprina causó cambios graves en los testículos, probablemente debido a los efectos directos sobre las células germinales. Se registraron linfopenia y trombocitopenia pronunciadas a esta dosis alta de coprina y el examen histológico mostró depresión de médula ósea e hiperplasia del bazo, el timo y los nódulos linfáticos. A la dosis baja (20 mg/kg) no se observaron efectos relacionados con el tratamiento, excepto una reducción pequeña pero significativa en el recuento de trombocitos. De acuerdo con los estudios en animales, la dosis oral más baja farmacológicamente activa de coprina es de 10 mg/kg de peso corporal en ratas y el “nivel sin efecto adverso observable” o índice de toxicidad NOAEL (sigla correspondiente en inglés a: *No Observed Adverse Effect Level*) es inferior a 20 mg/kg de peso corporal en ratas (95).

Además, los efectos causados por coprina son similares a los observados después de la exposición a agentes alquilantes. También la coprina es mutagénica *in vitro* en el test de Ames utilizando *Salmonella thyphimurium* como organismo indicador para la actividad mutagénica (112). Estas observaciones indican que probablemente coprina sea un carcinógeno genotóxico, y de acuerdo con los estudios disponibles, no es posible proporcionar un nivel de ingesta segura de carpóforos de *Coprinosis atramentaria*.

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; **Familia:** *Hygrophoraceae* (113): *Ampulloclitocybe clavipes*(Pers.) Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys [Bas.: *Agaricus clavipes* Pers.; sin.: *Agaricus comitalis* Pers., *Clitocybe clavipes* (Pers.) P. Kumm., *Clitocybe comitalis* (Pers.) P. Kumm., *Omphalia clavipes* (Pers.) Quél., *Clavicybe clavipes* (Pers.) Harmaja, *Clitocybe squamulosoides* P.D. Orton]. **Familia:** *Coprinaceae*: *Coprinosis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo [Bas.: *Agaricus atramentarius* Bull.; sin.: *Coprinus atramentarius* (Bull.) Fr.] es un hongo saprófito de crecimiento solitario o fasciculado alrededor de la madera muerta, que crece en zonas templadas a boreales, en los países nórdicos europeos, en las regiones urbanas y a lo largo de los caminos en EE.UU. (95, 97), en Argentina (Buenos Aires y en las provincias de Córdoba, Neuquén, Río Negro y Tierra del Fuego) (7, 9, 94); *Coprinosis*

*insignis* (Peck) Redhead, Vilgalys & Moncalvo [Bas.: *Coprinus insignis* Peck]; *Coprinopsis variegata* (Peck) Redhead, Vilgalys & Moncalvo [Bas.: *Coprinus variegatus* Peck; sin.: *C. ebulbosus* Peck, *C. quadrifidus* Peck, *C. atramentarius* var. *variegatus* (Peck) Rick]; *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. [Bas.: *Agaricus comatus* O.F. Müll.; sin.: *Coprinus ovatus* (Schaeff.) Fr., *C. columellifer* Speg.] es un hongo saprófito y nematófago, que crece en campo abierto, jardines, bosques, manglares y otras áreas fertilizadas, tiene la misma distribución geográfica en Europa, Estados Unidos y Argentina que *Coprinopsis atramentaria* (93, 97), pero en Argentina que se extiende además a provincias del noroeste, centro y noreste (provincias de Salta, Tucumán, Catamarca, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires, Mendoza, Neuquén y Río Negro) (7, 9, 94).

## **2.6. Toxíndrome neurotóxico alucinogénico. Micetismo por psilocibina y derivados indólicos.**

**Este micetismo es provocado por especies de los géneros *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Conocybe* y *Pluteus*.** Las variedades alucinógenas de *Psilocybe* fueron utilizadas por los pueblos prehistóricos con fines religiosos y de curación. En la actualidad, la mayoría de las personas que consumen hongos de psilocibina buscan intencionalmente una experiencia psicodélica. Los hongos alucinogénicos suelen denominarse "hongos mágicos", refiriéndose a aquellos que contienen los componentes psicoactivos psilocina y psilocibina, los principales componentes activos de especies de *Psilocybe* (114). El uso de hongos mágicos se ha vuelto popular entre los jóvenes, especialmente de EE.UU., porque son relativamente baratos y hay menos conciencia de culpa que con otras drogas. *Psilocybe semilanceata* y *P. subbalteatus* están presentes abundantemente en el centro y el norte de Europa y son tóxicos (115).

**Varias especies tóxicas** que contienen psilocibina **se encuentran** en regiones tropicales y subtropicales de **todo el continente americano** [América del Sur, América Central y América del Norte (Méjico y EE.UU.)] (116).

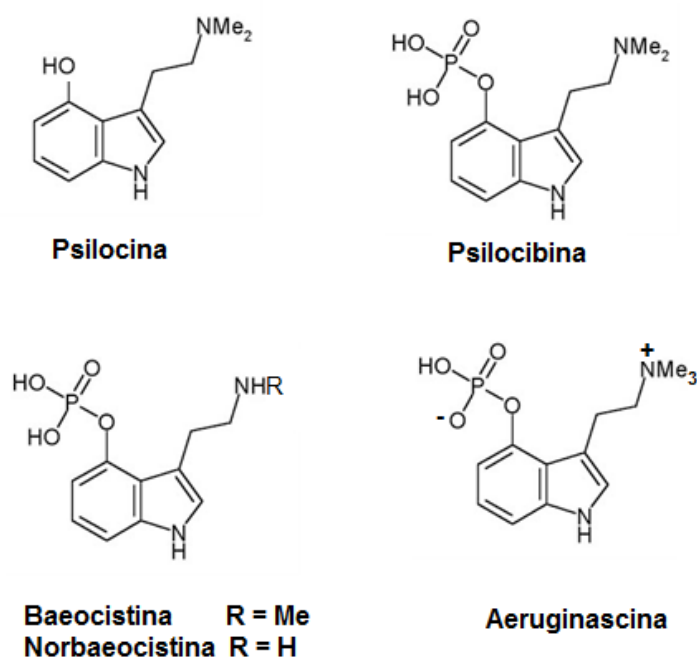
**Período de latencia:** El período de latencia es muy corto; de 15 a 30 minutos después de la ingestión. Se dice que es de unos treinta minutos después de la ingestión de ~ 20 g de carpóforos frescos o 4-8 mg de psilocibina pura (117).

**Síntomatología:** Presentan alteraciones sensoriales, pulso lento, tensión baja, visión borrosa, midriasis, sudoración, debilidad, mareos, escasos síntomas digestivos. Aumento de la percepción del color, percepciones alteradas de espacio-tiempo, trastornos del estado de ánimo, efectos emocionales que van desde el éxtasis a la ansiedad y, a veces, alucinaciones o delirios, risas involuntarias, bienestar. Las respuestas a la toxina pueden variar en cada individuo. Un paciente puede sentirse relajado, mientras que otro puede experimentar ansiedad, mareos, o tensión. En algunos casos, puede ocurrir malestar abdominal y náuseas junto con diarrea y vómitos. Alucinaciones auditivas y visuales, desorientación, taquicardia, trastornos mentales, agresividad, pérdida de control, euforia, actos de violencia, **convulsiones, coma mortal si son dosis altas.** Tanto las alucinaciones como los cambios de comportamiento, dependen del estado de ánimo y de la personalidad del intoxicado. Pueden ocurrir respuestas de pánico incluyendo locura o miedo a la muerte. Los efectos visuales aumentan a lo largo de los períodos posteriores y desaparecen más tarde. También se han registrado hipertensión, midriasis, taquicardia, disritmias e infarto de miocardio (118).

Los síntomas duran generalmente unas 6 horas, en algunos casos nueve horas y raramente 12 horas, después de la ingestión, generalmente sin secuelas, salvo en niños pequeños, a los que les puede producir la muerte.

**Toxinas:** El efecto narcótico que producen por ingestión ciertas especies de hongos se debe a compuestos indólicos derivados del 4-hidroxiindol (sustitución que rara vez se observa en plantas), como: **psilocibina** (4-fosforiloxi- *N,N*-dimetiltriptamina), **psilocina**, **baeocistina** y **norbaeocistina** (Fig. 17) que provienen del metabolismo del aminoácido triptofano. La psilocina es el compuesto desfosforilado que se oxida y se descompone fácilmente y no es de naturaleza alucinogénica. Además, norbaeocistina y baeocistina son derivados sin *N*-metilos y *N*-monometilado de psilocibina respectivamente. Todos estos compuestos son triptaminas, activas en el sistema nervioso central, con efectos alucinogénicos (119). Psilocina es un alcaloide indólico que se encuentra en especies del género *Psilocybe* que

presenta una bioactividad similar a la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), harmina y otras triptaminas psicoactivas [bufotenina, DMT (*N,N*-dimetilriptamina), etc.], que inducen efectos psicoactivos, tales como: cambios en la percepción, alteración del estado de ánimo y alucinaciones con colores brillantes (120). Se han estudiado las alteraciones de la percepción por acción exógena con sustancias alucinogénicas y por producción endógena por compuestos indólicos como DMT, que se ha obtenido también en orina de pacientes esquizofrénicos (121, 122) y se ha estudiado la cinética a corto y largo plazo mediante estudios de marcación (123). Son sustancias hidrosolubles, desaparecen con el agua de cocción, pero no con la desecación de los hongos. El compuesto fosforilado psilocibina también está presente y se convierte fácilmente en psilocina *in vivo*. Baeocistina y norbaeocistina se encuentran como componentes menores en hongos psicoactivos del género *Psilocybe*. El derivado trimetilado de psilocibina, **aeruginascina** (Fig. 17), se ha aislado de otro hongo alucinogénico, *Inocybe aeruginascens* (124).



**Figura 17:** Estructuras químicas de psilocina, psilocibina, baeocistina, norbaeocistina y aeruginascina.

Los compuestos psilocibina y psilocina y sus derivados se han aislado de más de 150 especies de hongos, pero se encuentran principalmente en los siguientes géneros: *Psilocybe*, *Panaeolus*, algunos *Gymnopilus*, y *Stropharia aeruginosa*. La mayor concentración de psilocibina se encuentra en *Psilocybe azurescens* de EE.UU. (Oregon) con hasta 1,8% de psilocibina, 0,5% de psilocina y 0,4% de baeocistina en peso seco, que es cultivado en EE.UU., Nueva Zelanda y Alemania. Todos estos compuestos indólicos pueden determinarse en los fluidos biológicos de los pacientes (125). *Conocybe cyanopus*, *Panaeolus subbalteatus*, *Pluteus salicinus* y *Psilocybe semilanceata* tienen cantidades moderadas (> 0,5% de peso seco) de psilocibina. *Psilocybe semilanceata* y *P. subbalteatus* son los únicos carpóforos que contienen psilocibina que están presentes abundantemente en el centro y el norte de Europa y son tóxicos (115). *Psilocybe semilanceata*, *P. cubensis*, *P. mexicana*, *P. bohemica* y *P. baeocistis* son las más comúnmente consumidas. Pequeñas cantidades de psilocina y 0,2%-0,4% de psilocibina se encuentran en los carpóforos de *Psilocybe mexicana*. Los valores de DL<sub>50</sub> de psilocibina en ratones vía i.v. e i.p. son 275 y 420 mg/kg respectivamente (126).

**Mecanismo de acción:** Estos compuestos indólicos presentan una similitud estructural con el neurotransmisor serotonina y el efecto alucinogénico de los hongos mágicos es por lo tanto causado por su interferencia con las acciones normales de la serotonina cerebral, como

se demostrara mediante tomografía de emisión de positrones (127). La psilocibina se convierte rápidamente en psilocina en el cuerpo a través de la desfosforilación. Psilocina es un agonista de receptor mixto y varios receptores serotoninérgicos, como 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, son parcialmente inhibidos por esta toxina. Tiene una alta afinidad por el receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> en el cerebro, donde imita los efectos de serotonina (5-HT o 5-hidroxitriptamina). Psilocina se une menos fuertemente con otros receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>1D</sub>. Se considera que el modo de acción de todas las triptaminas alucinogénicas mencionadas ocurre a través del agonismo no selectivo de varios receptores serotoninérgicos del sistema nervioso central, específicamente los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (119, 128, 129).

**Especies causantes del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Orden: *Agaricales*; **Familia:** *Strophariaceae* (o *Hymenogastraceae* según la clasificación): *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer [Bas.: *Stropharia cubensis* Earle] crece en Argentina (provincias de Entre Ríos y Buenos Aires e Islas Malvinas; también crece en otros países de América Central y del Sur: Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Dominica, Ecuador, El Salvador, Guadalupe (Guadeloupe), Guatemala, Guyana francesa, Martinica (Martinique); Panamá; Perú; Puerto Rico; Trinidad Tobago y Venezuela (9, 94, 130, 131); *Psilocybe mexicana* R. Heim crece en Colombia, Costa Rica y Guatemala (131, 132) como *P. subacutipilea* (131); *Psilocybe cyanescens* Wakef. crece en Guatemala (131); *Psilocybe semilanceata* (Fr.) P. Kumm. crece en Chile, centro y el norte de Europa (131); *Psilocybe caerulipes* Peck; *Psilocybe coprophila* (Bull.) P. Kumm. [Bas.: *Agaricus coprophilus* Bull.; sin.: *Deconica coprophila* (Bull.) Fr.] crece en Argentina (provincias de Córdoba, Buenos Aires y Tierra del Fuego, e Islas Malvinas) (7, 94, 130, 131); *Stropharia aeruginosa* (Curtis) Qué. crece en Francia y Brasil (131); *Stropharia aeruginosa* var. *neuquenensis* M.M. Moser & Singer crece en Argentina (7, 94, 131); *Protostropharia semiglobata* (Batsch) Redhead, Moncalvo & Vilgalys [Bas.: *Agaricus semiglobatus* Batsch; sin.: *Stropharia semiglobata* (Batsch) Qué., *Psilocybe semiglobata* (Batsch) Noordel.]; *Stropharia coronilla* (Bull.) Qué. crece en Francia, Argentina (provincia de Córdoba) y Brasil (7, 9, 94, 131); *Stropharia coronilla* var. *magnispora* Raithelh. crece en Argentina (7, 94, 131). **Familia:** *Coprinaceae*: *Panaeolus papilionaceus* (Bull.) Qué. [Bas.: *Agaricus papilionaceus* Bull.; sin.: *Panaeolus sphinctrinus* (Fr.) Qué., *P. campanulatus* (L.) Qué., *P. retirugis* (Fr.) Gillet] crece en Francia y Argentina (provincias de Salta, Tucumán, Catamarca, Chaco, San Juan, Mendoza, Córdoba, Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y Tierra del Fuego, e Islas Malvinas) (7, 9, 94, 130); *Panaeolus cyanescens* (Berk. & Broome) Sacc.; *Panaeolus fimicola* (Pers.) Gillet [Bas.: *Agaricus fimicola* Pers.] crece en Argentina (provincia de Córdoba) (94); *Panaeolus cinctulus* (Bolton) Sacc. [Bas.: *Agaricus cinctulus* Bolton; sin.: *Panaeolus subbalteatus* (Berk. & Broome) Sacc., *P. alveolatus* Peck, *P. acidus* Sumstine, *P. semiglobatus* (Murrill) Sacc. & Trotter, *P. rufus* Overh., *P. variabilis* Overh., *P. venenosus* Murrill, *P. pumilus* (Murrill) Murrill, *P. dunensis* Bon & Courtec, *Psilocybe vernalis* Velen.] crece en Europa, Asia (Japón, India, Rusia), África (Sudáfrica), Oceanía (Australia y Nueva Zelanda), América del Norte (Canadá, EE. UU., Méjico), América del Sur [Argentina (provincia de Misiones), Brasil y Chile] (94, 133); *Psathyrella candolleana* (Fr.) Maire [Bas.: *Agaricus candolleanus* Fr.; sin.: *Hypholoma candolleianum* (Fr.) Qué., *Agaricus appendiculatus* Bull., *Hypholoma appendiculatum* (Bull.) Qué.] crece en Europa, América del Norte y en América del Sur [Argentina (provincias de Tucumán, Misiones, Córdoba, Buenos Aires y Tierra de Fuego; Andes Patagónicos)] (7, 9, 94).

### **2.7. Toxíndrome psicotrópico por estirilpironas y gimnopilinas. Micetismo debido al hongo alucinogénico *Gymnopilus spectabilis* o *G. junonius*:**

El hongo alucinogénico *Gymnopilus spectabilis* (= *Gymnopilus junonius*) es conocido como “hongo grande de la risa” en Japón (“*Ohwaraitake*” en japonés) ya que puede causar ese efecto en aquellos que lo ingieren crudo (134-136). El extraño comportamiento de las personas intoxicadas por ingestión de este hongo se ha registrado en la literatura (“*Konjaku Monogatari*”) en el siglo XII (135). Esta especie carnosa de gran porte, de sombrero color castaño-amarillento a anaranjado, que al tocar los ejemplares maduros deja las manos

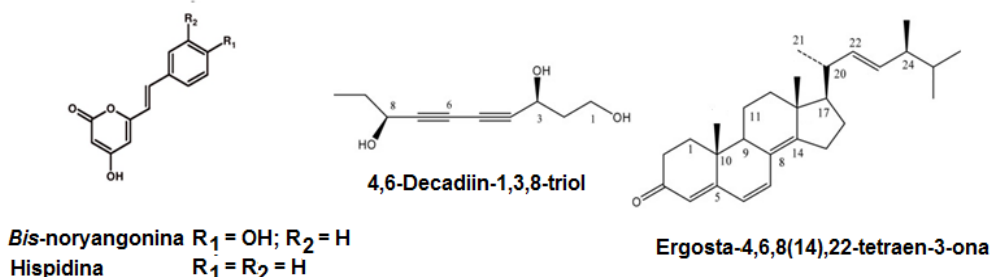


manchadas de color anaranjado es muy amarga y muy tóxica (134). El sabor amargo desaparece por secado y por cocción en agua o vinagre. Se lo consume mucho en el norte de Argentina y en Uruguay para acompañar carnes (en Uruguay el llamado chivito) (134). Puede producir alteraciones de tipo alucinatorio y sedante por contener sustancias psicotrópicas (varias diferentes a las de otros hongos alucinogénicos, sumadas a la psilocibina en algunos), por lo que su consumo puede acarrear problemas serios para la salud.

**Tiempo de latencia:** Es de 15 a 30 minutos.

**Sintomatología:** Estos hongos provocan un efecto embriagador en las personas que los comen, las cuales pueden entusiasmarse mucho, bailar y cantar, y tener diversos tipos de visiones. Las personas que ingieren los carpóforos de este hongo suelen tener alucinaciones visuales y auditivas. Los consumidores describen efectos marcadamente diferentes a las especies de *Psilocybe*, ya que *G. spectabilis* aumenta la claridad, mientras que *Psilocybe* la quita (136). Este hongo causa intoxicaciones con predominio alucinogénico, debido a la presencia de psilocibina en algunos ejemplares según su ubicación geográfica (o variedad), a estirilpironas como *bis-noryangonina* e *hispidina* que producen estado de embriaguez y alucinaciones, así como a los compuestos neurotóxicos denominados *gimnopilinas* con actividad despolarizante en el sistema nervioso central.

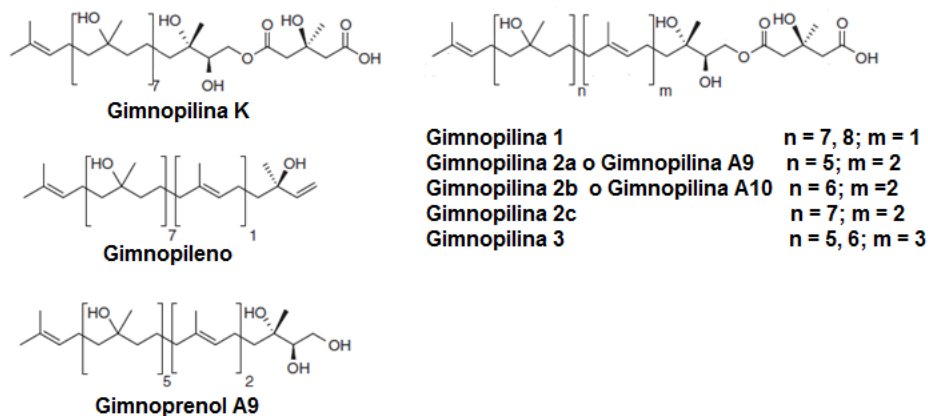
**Toxinas:** *Gymnopilus spectabilis* o *G. junonius* es una fuente de metabolitos únicos, varios alucinogénicos, que le dan el sabor fuertemente amargo, que lo hace indeseable como comestible. De los carpóforos de *G. spectabilis* de Corea se aislaron **4,6-decadiín-1,3,8-triol**, **ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona** (Fig. 18) y las estirilpironas antioxidantes y antimicrobianas ***bis-noryangonina*** e ***hispidina*** (Fig. 18) (137), que están relacionadas estructuralmente con las  $\alpha$ -pironas que se encuentran en la bebida psicoactiva "*kava*" (136). **Hispidina** es un inhibidor potente, permeable a las células y reversible de la isoforma C $\beta$  de proteínaquinasa C (PKC $\beta$ ; CI<sub>50</sub> = 2  $\mu$ M); con efecto citotóxico mayor en células tumorales.



**Figura 18:** Estructuras químicas de *bis-noryangonina*, *hispidina*, 4,6-decadiín-1,3,8-triol y ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

Los primeros compuestos que se aislaron de los carpóforos de *G. spectabilis* o *G. junonius* de Japón fueron **gimnoprenoles** (**gimnoprenol-A**, **-B** y **-F**), que son un tipo novedoso de **polisoprenopoliol** con 45 a 50-60 átomos de carbono (138-141) que suelen llamarse **gimnopilinas**. De la misma especie recolectada en Alemania se aisló **gimnoprenol F**, redesignado como **gimnopilina**, un principio amargo, que resultó ser un medio éster del ácido  $\beta$ -metil- $\beta$ -hidroxiglutarico con gimnoprenol-A (138, 139). También se aislaron y se caracterizaron **cerevisterol**, **compuestos acetilénicos** (142), el esteroide **ergosterol**, que es un metabolito muy frecuente en hongos, y el ácido (*E,E*)-7,12-dioxooctadeca-8,10-dienoico (**ácido ostopánico**, C<sub>18</sub> H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) que es un **ácido graso** citotóxico que inhibe *in vitro* el crecimiento de células de leucemia linfocítica P-388 con una (DE: dosis efectiva) DE<sub>50</sub> de 1,5 mg/ml (143). De los carpóforos se aislaron como principios amargos algunas **gimnopilinas** activas sobre el sistema nervioso central por seguimiento de la actividad despolarizante mediante una preparación de médula espinal de rata recién nacida (135). Mediante separación y purificación completa de la mezcla de gimnopilinas se obtuvieron tres grupos de gimnopilinas con respecto al número de dobles enlaces centrales: **gimnopilina 1** ( $m = 1$ ), **gimnopilina 2** ( $m = 2$ ) y **gimnopilina 3** ( $m = 3$ ) (Fig. 19). La actividad despolarizante sólo se encontró para las gimnopilinas 2 y 3. La separación adicional de la gimnopilina 2 dio las **gimnopilinas 2a**, **2b** y **2c** (Fig. 19), cuya actividad despolarizante disminuyó en el siguiente

orden: 2a > 2b > 2c. La muestra de gimnopilina 2a mostraba actividad despolarizante aún a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . La gimnopilina 3 exhibió actividad en una solución más diluida (135). Posteriormente, se obtuvo una nueva gimnopilina llamada **gimnopilina K** (Fig. 19), junto con cuatro compuestos conocidos, como: **gimnopilina A9** o **gimnopilina** (135), **gimnopilina A10** (135), **gimnopileno** (141) y **gimnoprenol A9** (135) (Fig. 19), que presentan actividad citotóxica contra las líneas celulares tumorales humanas A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 y HCT-15 (144).



**Figura 19:** Estructuras químicas de gimnopilina K, gimnopilina A9, gimnopilina A10, gimnopileno y gimnoprenol A9.

Si bien se identificó **psilocibina** como sustancia alucinogénica en algunos hongos norteamericanos (este de EE.UU.) y europeos de *G. spectabilis* y en otras especies de *Gymnopilus* (145), no es común en los carpóforos de *G. spectabilis* o *G. junonius* que crecen en Japón (142). Los especímenes que se encuentran en Corea o en el este de EE. UU. suelen contener psilocibina, contrariamente a los del oeste de EE. UU. En Italia, el consumo de esta especie está prohibido, al igual que el de las especies de los géneros *Stropharia* y *Psilocybe*, por contener sustancias alucinogénicas en una cantidad variable.

**Mecanismo de acción:** Se considera que las gimnopilinas son un factor clave en la intoxicación por *G. spectabilis* o *G. junonius*. Se encontró que las **gimnopilinas** de carpóforos de esta especie actúan sobre el sistema circulatorio en base a los efectos de estos compuestos sobre la presión sanguínea y la actividad contráctil del músculo liso vascular (preparados de aorta) de rata (146). Norepinefrina y angiotensina II contraen la aorta mediante la activación de sus receptores específicos en las células del músculo liso vascular. La estimulación mediante concentración alta de  $\text{K}^+$  contrae la aorta por despolarización de la membrana celular que activa directamente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Las gimnopilinas relajaron las tiras de aorta que fueron contraídas mediante estos tres tipos diferentes de estimulación, lo que indica que las gimnopilinas no compiten con norepinefrina ni angiotensina II por la unión a los receptores para relajar la aorta. Los resultados sugieren que el mecanismo de la vasodilatación inducida por gimnopilina es independiente de las cascadas de señales para la contracción que preceden a un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A diferencia de muchos vasodilatadores de origen vegetal que actúan mediante estimulación del endotelio, se demostró que las gimnopilinas tienen un mecanismo directo de vasodilatación sobre las células del músculo liso vascular (146). Como las gimnopilinas provocan un fuerte efecto vasodilatador, podrían disminuir la presión sanguínea. Por el contrario, las gimnopilinas causaron hipertensión y ligera disminución de la frecuencia cardíaca después de ser inyectadas. Es decir que, las gimnopilinas podrían aumentar el volumen sistólico del corazón y/o la tensión de la arteria a través de la excitación del nervio vasomotor que supera el efecto relajante directo sobre el músculo liso vascular. Además, se demostró que las gimnopilinas activan los receptores ligados a proteína G (GPCRs, en inglés: *G protein-coupled receptors*) en particular los acoplados a proteína Gq expresados en neuronas y células gliales en los ganglios de la raíz dorsal y la corteza cerebral de la rata (147). Este efecto puede llevar a la despolarización de

las motoneuronas. Es decir, las gimnopilinas pueden distribuirse en el sistema nervioso central al cruzar la barrera hematoencefálica y entonces actuar directamente sobre las células del sistema nervioso central para excitar al centro vasomotor. Esto podría ser causa de los síntomas del micetismo. Se demostró que gimnopilina moviliza el ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular en las células ganglionares de la raíz dorsal. Para ello, se examinaron los efectos de gimnopilina sobre las concentraciones intracelulares del ión calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de células (neuronas y células no neuronales) cultivadas aisladas del ganglio de la raíz dorsal de rata (147). Estos resultados indican que gimnopilina activó a la fosfolipasa C y movilizó  $\text{Ca}^{2+}$  del almacenamiento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células no neuronales del ganglio de la raíz dorsal. Es decir que la gimnopilina actúa directamente sobre las células aisladas del sistema nervioso de los mamíferos (147). Posteriormente, se demostró que las gimnopilinas actúan directamente sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina e inhiben su actividad (148). Esta acción biológica de gimnopilinas puede ser una de las causas de la intoxicación por *G. spectabilis* o *G. junonius*.

**Especie causante del micetismo:** División: *Basidiomycota*, Clase: *Agaricomycetes*, Orden: *Agaricales*, Familia: *Cortinariaceae*: *Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Singer actualmente el nombre correcto es *Gymnopilus junonius* (Fr.) Ort. [Bas.: *Agaricus junonius* Fr.; sin.: *Agaricus aureus* Sowerby, *Agaricus aureus* Bull., *Lepiota aurea* Gray, *Gymnopilus spectabilis* A.H. Smith, *G. spectabilis* var. *junonius* (Fr.) Kühner & Romagn., *Pholiota junonia* (Fr.) P. Karst., *Pholiota grandis* Rea, *Pholiota spectabilis* var. *junonia* (Fr.) J.E. Lange,] crece en Asia (Corea, Japón), Norte de África, Australia, algunos países europeos, América del Norte (algunos estados de EE.UU.) y América del Sur (Uruguay, Argentina, Paraguay y Chile) (149) por lo general en densos grupos o a veces solitario, en tocones y troncos de caducifolios y más frecuente en coníferas; es muy común en los bosques de *Eucalyptus* spp., donde suele crecer en la base de los troncos de los árboles vivos (hongo parásito), aunque también en tocones muertos (hongo saprófito). Su sombrero puede alcanzar más de 20 cm de diámetro y el estipe puede medir hasta 25 centímetros de largo y unos 2,5 centímetros de grosor. Algunos autores consideran a *Gymnopilus junonius* (Fr.: Fr.) Ort. como una variedad de *Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Singer. Esta especie era conocida anteriormente como *Gymnopilus spectabilis* o *Pholiota spectabilis* var. *junonia* (Fr.) J.E. Lange.

### **2.8. Toxíndrome agudo de rabdomiólisis. Micetismo por *Russula subnigricans*:**

*Russula subnigricans* es un hongo tóxico conocido como *Nisekurohatsu* en Japón, que se encuentra muy distribuido en Asia, en países como Japón, China, Taiwán, Corea y Nepal. La especie fue nombrada por el micólogo japonés Tsuguo Hongo en 1955. La ingestión de los carpóforos ha provocado intoxicaciones graves en Taiwán, Japón, Corea y China, causando rabdomiólisis (150-153). Dado que *R. subnigricans* es muy similar a un hongo comestible, *Russula nigricans*, plantea un riesgo para los humanos. Su carne se torna de color rojo pálido cuando se corta, tiñéndose de rojo lentamente, pero no se vuelve negra como ocurre con *Russula nigricans*. La identificación de las especies del género *Russula* es difícil y es considerada un desafío, porque las especies se distinguen entre sí por diferencias sutiles, arbitrarias y muy variables (154). Afortunadamente, la mayoría de las especies de *Russula* no son tóxicas, si bien varias provocan dolor de estómago, pero la excepción es la especie mortal *Russula subnigricans*.

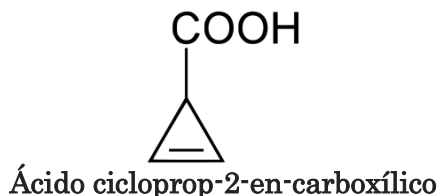
**Período de latencia:** Latencia muy corta. Los síntomas se inician entre 30 minutos y 2 horas después del consumo de los carpóforos.

**Sintomatología:** Los síntomas consisten en náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Estos son síntomas comunes e inespecíficos de intoxicación por ingestión de hongos. Sin embargo, dentro de las 6-12 horas las víctimas también tienen debilidad, dolores musculares, deterioro del habla, convulsiones, contracción de pupila, rigidez en los hombros, dolores de espalda, dificultad para respirar y mioglobinuria, debido a la rabdomiólisis, que es un síndrome doloroso de degradación y necrosis del tejido muscular, que da como resultado el volcado de los componentes intracelulares en la circulación y en el líquido extracelular, lo que convierte a la orina en color rojo y contribuye a la insuficiencia

renal (155). La rhabdomiólisis también puede ser inducida por daño físico al tejido muscular o abuso de drogas como la cocaína. Se estima que ~10-50% de los pacientes con rhabdomiólisis desarrollan insuficiencia renal aguda. Los casos más graves pueden presentar insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal aguda, edema pulmonar, taquicardia ventricular, shock circulatorio y muerte (150-152, 156). Justamente los hongos que causan rhabdomiólisis pueden producir miocarditis, miocardiopatía, disritmias y colapso cardiovascular (4, 156, 157). La mayoría de las muertes ocurren 12 a 24 horas después de la ingestión (155). El estudio bioquímico muestra un aumento de la enzima creatínfosfoquinasa y alteración electrolítica severa (hipercalcemia, hipocalcemia) (156).

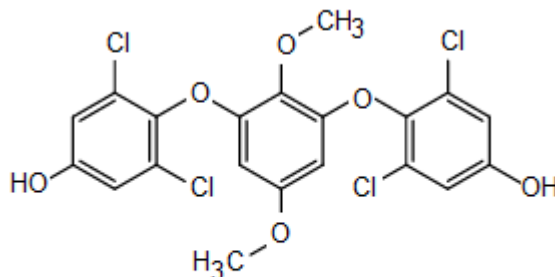
**Historia de la intoxicación. Primeros casos clínicos y valores de laboratorio clínico:** Las intoxicaciones por *Russula subnigricans* son conocidas en Japón desde 1954. En el período 2005 a 2007 se produjeron 5 fallecimientos, seguidos de 2 más hasta 2009 (150). En octubre de 2001, se describió que el consumo de carpóforos de *R. subnigricans* provocaba rhabdomiólisis, pensando que era la primera vez que se describía un micetismo con rhabdomiólisis (156), desconociendo que un mes antes se había publicado la intoxicación por el consumo de *Tricholoma equestre*, que cursaba con rhabdomiólisis y tiempos de latencia muy largos, como se ha analizado en la Parte 2 de esta serie de artículos (2). El brote de rhabdomiólisis publicado en 2001 se debió al consumo de una sopa cocinada con *Russula subnigricans* (156). De nueve comensales, dos presentaron rhabdomiólisis grave pero no mortal. Inicialmente, todos tuvieron dos horas después de la ingesta un cuadro gastrointestinal (náuseas, vómitos y diarrea) que en siete individuos remitió de manera espontánea a las 24 horas. En cambio, los dos restantes, seis horas más tarde, presentaron además un cuadro de rhabdomiólisis. Uno de ellos presentó al segundo día un pico máximo de creatínfosfoquinasa de 2.225 U/L; no desarrolló otras complicaciones y fue dado de alta totalmente recuperado. En cambio el otro, presentó un pico máximo de creatínfosfoquinasa de 204.500 U/L, y se acompañó de debilidad, dolores musculares generalizados, disnea, insuficiencia respiratoria, trastornos electrolíticos [ión potasio (K<sup>+</sup>) 6,5 mEq/L], insuficiencia renal, taquicardia ventricular y shock circulatorio. Requirió ventilación asistida y hemodiálisis. Respondió al tratamiento médico y fue dado de alta 33 días después de su ingreso (156). En Japón, en 2010 hubo un nuevo caso de un hombre de 62 años de edad, que fue internado con dolor de espalda, debilidad muscular y mialgias, síntomas que aparecieron 20 horas después de haber consumido una comida con *Russula subnigricans* (158). La debilidad muscular persistió durante más de una semana; el pico máximo de creatínquinasa fue de 42.689 U/L. La rhabdomiólisis fue confirmada mediante Resonancia Magnética Nuclear (158). En 2015 se describió la intoxicación de 7 miembros de una familia con *Russula subnigricans*. Sus manifestaciones clínicas variaron desde síntomas gastrointestinales a rhabdomiólisis, con una muerte (159). En 2016 se describió el primer caso en Corea de rhabdomiólisis por *Russula subnigricans*. El paciente de 51 años padeció rhabdomiólisis, insuficiencia renal aguda, hipocalcemia severa, insuficiencia respiratoria, taquicardia ventricular, shock cardiogénico y muerte. (152) Se investigaron casos de micetismos en el sur de China desde 1994 a 2012, que involucraron a 852 pacientes y 183 muertes, siendo *Russula subnigricans* la especie que causó la cuarta parte de todas las intoxicaciones presentadas (155). Una clave para la supervivencia de los pacientes con rhabdomiólisis causada por *Russula subnigricans* es el reconocimiento precoz y el cuidado intensivo de apoyo (159).

**Toxina:** El compuesto responsable de la rhabdomiólisis por ingestión de *Russula subnigricans* es el **ácido cicloprop-2-en-carboxílico** (Fig. 20), con un ciclo muy pequeño y muy tensionado; tiene como marcador un aumento en la actividad de la enzima creatínfosfoquinasa sérica tanto en ratones como en humanos (150). Al ser administrado en forma oral a ratas provocó rhabdomiólisis. El valor de DL<sub>100</sub> (dosis letal que mata al 100% de las ratas) de este ácido por vía oral es de 2,5 mg/kg, que correspondería en humanos al consumo de dos a tres carpóforos. El ácido cicloprop-2-en-carboxílico es muy inestable y al concentrar soluciones de esta toxina se produce su polimerización, causando la pérdida de su toxicidad (150).



**Figura 20:** Estructura química del ácido cicloprop-2-en-carboxílico.

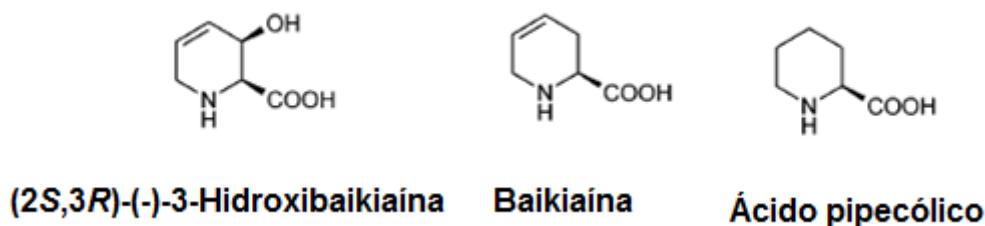
Los carpóforos también poseen un compuesto polifenólico tetraclorado con actividad citotóxica, denominado **rusufelina A** (Fig. 21) (160).



**Rusufelina A**

**Figura 21:** Estructura química de rusufelina A.

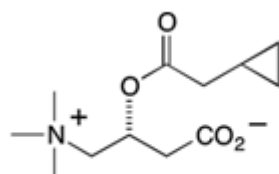
Cuando se aisló por primera vez rusufelina A se creyó que era la toxina responsable de la intoxicación hasta que se obtuvo el ácido ciclopropen-2-carboxílico (150). Las otras especies que producen rabiomólisis por ingestión pertenecen al género *Tricholoma* y son: *T. equestre* y *T. terreum*. Sin embargo ambas no parecen contener el ácido descrito en *Russula subnigricans*. Además, a diferencia de esta última, las dos especies de *Tricholoma* presentan sintomatología demorada con tiempos de latencia muy largos como se ha visto en la Parte 2 de esta serie de artículos (2). De *R. subnigricans* se aislaron también el aminoácido **(2*S*,3*R*)-(-)-3-hidroxi**baikiaína****, junto con **baikiaína** y **ácido pipecólico** (Fig. 22) (73).



**Figura 22:** Estructuras químicas de (2*S*,3*R*)-(-)-3-hidroxi**baikiaína**, junto con **baikiaína** y **ácido pipecólico**.

Recientemente, se determinó que **ciclopropilacetil-(*R*)-carnitina** (Fig. 23) es un componente de *Russula subnigricans* que sirve como marcador químico específico de esta especie, ya que provee señales en el espectro de resonancia magnética nuclear protónica (<sup>1</sup>H-RMN) que aparecen en la región de campos altos, que son fácilmente reconocibles y no se superponen con las numerosas señales del extracto crudo (151). De esta manera, se puede discriminar *R. subnigricans* auténtica de especies similares de *Russula* no identificadas.





**Ciclopropilacetil-(*R*)-carnitina**

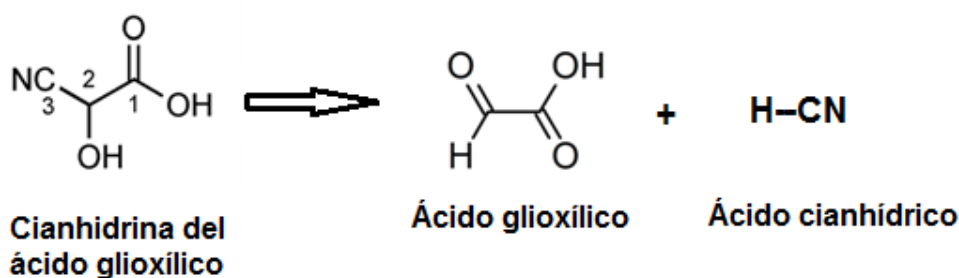
**Figura 23:** Estructura química de ciclopropilacetil-(*R*)-carnitina.

**Mecanismo de acción:** Si bien no se conoce el mecanismo de acción del ácido cicloprop-2-en-carboxílico, esta toxina parece desencadenar una cascada de reacciones en el cuerpo, lo que provoca una descomposición generalizada del músculo; llevando a problemas respiratorios y cardíacos (problemas en músculos del diafragma y del corazón). Debido a la degradación del tejido muscular, se transportan cantidades masivas de uno de sus componentes químicos (mioglobina) a los riñones (150). La rbdomiólisis provocada por ingestión de *Russula subnigricans* parece ser diferente a la causada por *Tricholoma equestre* (157), ya sea por la toxina o por el mecanismo de acción.

**Especie causante del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Homobasidiomycetae*; Subclase: *Hymenomycetes*; Orden: *Russulales*; Familia: *Russulaceae*; ***Russula subnigricans*** Hongo proviene del Este Asiático.

### 2.9. Toxíndrome cianogénico. Micetismo por *Marasmius oreades*:

Las plantas y hongos cianogénicos están muy distribuidos en la naturaleza. Uno de los hongos cianogénicos es *Marasmius oreades* (“*senderuela*”; forma anillos de hadas) que es, por lo tanto, muy tóxico si se lo come crudo por los efectos del cianuro. Tanto los carpóforos como los micelios de *M. oreades* producen grandes cantidades de cianuro de hidrógeno (así se llama en estado gaseoso) o ácido cianhídrico (cuando se encuentra en solución acuosa) (HCN), lo cual ya había sido demostrado en el siglo XIX (161). Este hongo es muy apreciado por su sabor, cuando está cocido, la carne es dulce, de olor a almendras y de color claro. El sabor dulce se debe a la presencia de **trehalosa** [ $\alpha$ -*D*-gluco-piranosil-(1→1)- $\alpha$ -*D*-glucopiranosido], que es un azúcar disacárido que permite que el hongo reviva al contacto con el agua, tras haber sido deshidratado, y permite la creación de esporas para volver a reproducirse.



**Figura 24:** Formación de ácido cianhídrico a partir de su precursor, la cianhidrina del ácido glioxílico.

**Compuesto químico precursor del ácido cianhídrico:** Se identificó la **cianhidrina del ácido glioxílico** (Fig. 24) como precursor del ácido cianhídrico en el hongo *Marasmius oreades* y otros hongos cianogénicos (162). De manera similar a las bacterias, la biosíntesis del ácido cianhídrico se inicia a partir de glicina, pero a diferencia de las bacterias, muchos hongos cianogénicos almacenan **ácidocianhídrico** en forma de cianhidrina, como en este caso es la **cianhidrina del ácido glioxílico**. Por lo tanto, la cianogénesis de *M. oreades* y otros hongos es diferente de la de las plantas, en las que el precursor es generalmente un glicósido. En cambio, los animales, especialmente los artrópodos, al igual que los hongos superiores, puedan usar cianhidrinas como precursores de ácido cianhídrico (163).

La **cianhidrina del ácido glioxílico** sirve como precursor en la defensa química parcialmente constitutiva y parcialmente activada ante lesiones. La detección de ácido cianhídrico en carpóforos aparentemente intactos podría atribuirse a la baja estabilidad de la **cianhidrina de ácido glioxílico**, que está en equilibrio con el **ácido cianhídrico** y **ácido glioxílico** (Fig. 24). El mecanismo de defensa química basado en **cianhidrina de ácido glioxílico** como precursor de ácido cianhídrico parece estar muy extendido en los hongos, ya que este compuesto se detectó no sólo en *Marasmius oreades*, sino también en los carpóforos de *M. wynnei*, *M. androsaceus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Clitocybe gibba*, *Clitocybe geotropa* y *Collybia confluens*.

**Acción en el área circundante a los carpóforos:** Se demostró mediante experimentos *in vitro* y de campo que el cianuro producido por *Marasmius oreades* y además concentrado por una disminución en la humedad del suelo cerca de los anillos de hadas (~25 cm), alcanzaría niveles inhibidores de la raíz del césped y del crecimiento de los carpóforos de algunos hongos (164). Es decir que *M. oreades* es un hongo parásito fitopatológico que destruye especies de Poáceas (ex Gramíneas), como *Poa pratensis* y *Festuca rubra* en las proximidades del anillo de hadas (164). Además del ácido cianhídrico, los poliacetilenos y los terpenos también son responsables de los efectos nocivos sobre las Poáceas (162). Se ha observado además que la **cianhidrina de ácido glioxílico** es capaz de formar complejos de potasio estables en fase gaseosa en base al comportamiento de la cianhidrina en espectrómetro de masa. Por lo tanto, las características quelantes del ácido glioxílico liberado por el hongo en el suelo podría retener los iones metálicos que son requeridos por las raíces del césped, complicando su desarrollo (165). Se demostró que el ácido cianhídrico se produce en *M. oreades* a partir de un precursor inactivo estable debido a una lesión, ya que los carpóforos dañados producen cantidades significativamente más altas de HCN que los intactos. También se verificó que la liberación de ácido cianhídrico ocurre enzimáticamente tras lesión de los carpóforos (162).

**Especie causante del micetismo:** División: *Basidiomycota*; Clase: *Agaricomycetes*; Subclase: *Hymenomycetes*; Orden: *Agaricales*; Familia: *Marasmiaceae*: ***Marasmius oreades*** (Bolt.) Fr. crece en Europa y en toda América del Norte, incluido Méjico, generalmente formando anillos de hadas.

#### **2.10. Toxíndrome inmunosupresor. Micetismo por tricotecenos macrocíclicos de *Podostroma cornu-damae***

El hongo *Podostroma cornu-damae* es de color rojo intenso, con forma de cuernos de ciervo. Sus carpóforos son muy tóxicos y han sido responsables de varias muertes en Asia, especialmente en Japón, China y Corea. En una serie de casos, confunden este hongo mortal en su forma inmadura, con *Ganoderma lucidum*, que no es tóxico y es consumido por sus propiedades curativas (166). La Enciclopedia Británica enumera a *Podostroma cornu-damae* como el segundo hongo superior más tóxico del mundo (167).

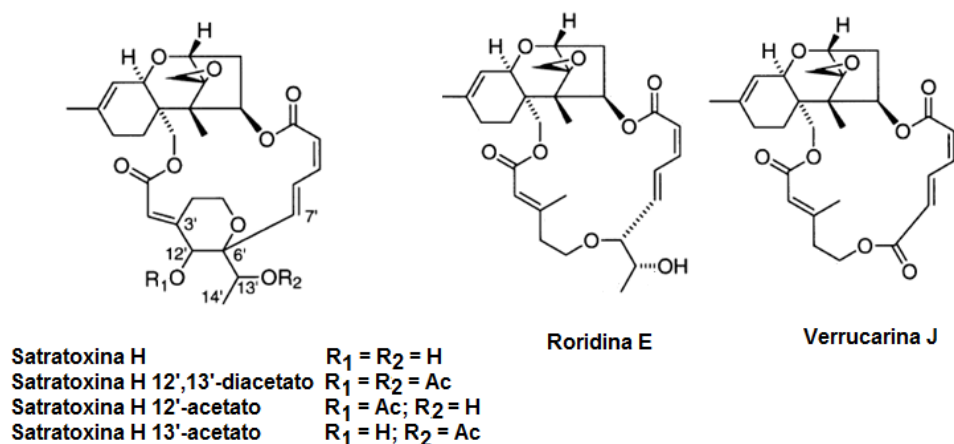
**Período de latencia:** Menor de 6 horas.

**Sintomatología:** La ingestión de *Podostroma cornu-damae* produce malestar gastrointestinal, diarrea, vómitos y deshidratación en las primeras etapas, seguido por hipotensión, oliguria, cambios en la percepción y alteración del estado mental. Sin tratamiento, los pacientes presentan una disminución en glóbulos blancos (leucopenia) y en plaquetas (trombocitopenia), descamación de la piel de las palmas y la caray también pérdida de **cabello** (166). Los pacientes finalmente mueren por disfunción orgánica múltiple. Los pacientes pueden sucumbir a la sepsis secundaria a la pancitopenia. En conclusión, **los sistemas primarios afectados por este micetismo son** el inmunológico y el hematológico. Se han registrado varios casos fatales de intoxicaciones en Japón como resultado del consumo de este hongo (168).

**Historia del micetismo. Casos clínicos:** En 2001 se describió la primera intoxicación producida por este hongo en 1999, cuando una persona de un grupo de cinco en Japón, murió dos días después de consumir un gramo de *Podostroma cornu-damae* empapado en sake. En 2000, un individuo también en Japón, murió después de comer el hongo frito. Los síntomas en estos casos incluyen los signos gastrointestinales, hematológicos, cutáneos y de



percepción ya mencionados, pero además encogimiento del cerebelo que causa impedimentos en el habla y problemas con el movimiento voluntario (169). En otro caso posterior, la autopsia reveló insuficiencia orgánica múltiple, que incluía insuficiencia renal aguda, necrosis hepática y coagulación intravascular diseminada (170). En un caso de intoxicación por ingestión de *Podostroma cornu-damae*, el paciente (hombre de 62 años) sufrió diarrea intensa, vómitos y deshidratación marcada en una primera etapa y, siete días después de haber ingerido el hongo, hemofagocitosis, además de leucocitopenia y trombocitopenia graves (171). Este paciente al día siguiente de haber ingerido *P. cornu-damae*, por la fuerte deshidratación que sufriera, recibió unos 9 litros de solución por vía intravenosa durante un período de 12 horas y fue trasladado a un centro médico general ese mismo día. Cuando llegó, se observó hipotensión debido a la alta permeabilidad capilar acompañada de fuga de proteínas, leucocitosis y eritema leve en el cuerpo. Inmediatamente el paciente fue tratado con hemodiafiltración continua y se administraron grandes cantidades de solución salina con monitoreo de la presión capilar pulmonar y del gasto cardíaco. En el séptimo día, la leucocitopenia y la trombocitopenia se volvieron severas y se observó hemofagocitosis. Se utilizaron eficazmente intercambio de plasma y factor estimulante de colonias de granulocitos para tratar estos trastornos hematológicos. Además, se observó hipouricemia, pérdida severa de pelo y las lesiones cutáneas cambiaron gradualmente a descamación de la piel. El paciente sobrevivió, si bien necesitó más de 30 días para recuperarse de la leucocitopenia (171). En 2009 se registró la intoxicación de 13 pacientes, con dos muertes, desde 1983 a 2008, por ingerir varios centímetros de *P. cornu-damae* (172). En 2013 se publicó un caso de intoxicación mortal en Corea, por consumo de *P. cornu-damae* (173). Un hombre de 73 años, tres horas después del consumo del hongo hervido presentó un cuadro gastrointestinal; al cuarto día de su ingreso presentó hipotensión, pancitopenia, dificultad respiratoria, hipoxemia y neumonía necrotizante. Fue intervenido, practicándose neumectomía izquierda. Posteriormente, presentó insuficiencia renal, hepática, coagulopatía intravascular diseminada y shock. A pesar de tratamiento intensivo falleció de disfunción multiorgánica al día 13 de su ingreso. La histología pulmonar mostró necrosis hemorrágica, infiltración pulmonar inflamatoria masiva, proliferación de fibroblastos y formación de una membrana hialina a lo largo de la pared alveolar (173). En ese mismo año, también en Corea, hubo otros dos casos por recolectar una pieza de *P. cornu-damae* mezclada con carpóforos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (168). Hirvieron los carpóforos y bebieron el agua durante un mes, hasta ser internados. Uno de los pacientes ingresó con un cuadro febril de 10 días de duración y falleció al sexto día de su ingreso, con un cuadro de pancitopenia, descamación de las palmas de las manos y pies, sepsis, neumonía y fracaso multiorgánico. El otro paciente sobrevivió después de un mes de tratamiento conservador (168).



**Figura 25:** Estructuras químicas de satratoxina H, satratoxina H 12',13'-diacetato, satratoxina H 12'-acetato, satratoxina H 13'-acetato, roridina E y verrucarina J.

**Toxinas:** De los carpóforos de *Podostroma cornu-damae* se aislaron los tricotecenos macrocíclicos: **satratoxina H**, **satratoxina H 12',13'-diacetato**, **satratoxina H 12'-acetato** y **satratoxina H 13'-acetato** (Fig. 25). Cuando se cultiva en cultivo líquido, el hongo produce además **roridina E**, **verrucarina J** y **satratoxina H** (Fig. 25). Con excepción de verrucarina J, una dosis de 0,5 mg de cada uno de estos compuestos por vía intraperitoneal en ratones, produjo la muerte de los mismos al día siguiente (169).

**Especie causante del micetismo:** División: *Ascomycota*; Clase: *Sordariomycetes*; Orden: *Hypocreales*; Familia: *Hypocreaceae*; *Podostroma cornu-damae* (Pat.) Hongo & Izawa [Bas.: *Hypocrea cornu-damae* Pat.; sin.: *Podocrea cornu-damae* (Pat.) Sacc. & D. Sacc.] crece en Japón, China, Corea y Java.

### 2.11. Toxíndrome hemolítico debido a ostreolisina de *Pleurotus ostreatus* y especies relacionadas:

*Pleurotus ostreatus* (“hongo ostra” o “gírgola”; “*Oyster Mushroom*”) es uno de los hongos más comúnmente cultivados y consumidos en todo el mundo (174). Se utiliza con frecuencia en la cocina japonesa, coreana y china como parte de las “*delikatessen*”, en Kerala (India) y en la cocina contemporánea checa y eslovaca. Este hongo tiene mejor sabor cuando se cosecha joven, a medida que el hongo envejece la carne se endurece y se vuelve acre y desagradable. No se informaron intoxicaciones tras el consumo de carpóforos de “*hongos ostra*” cocidos, sino por el contrario son considerados beneficiosos para la salud (175). Sin embargo, hay algunos indicios de que la ingesta de grandes cantidades de este hongo crudo o insuficientemente cocido puede dar lugar a intoxicaciones (176, 177). Hay también otras especies similares como *Pleurotus citrinopileatus* (“hongo ostradorada”; “*Golden Oyster*”) y *P. eryngii* (“hongo ostra rey”; “*King Oyster*”) y sus variedades que son también comestibles, comúnmente cultivados y consumidos (110).

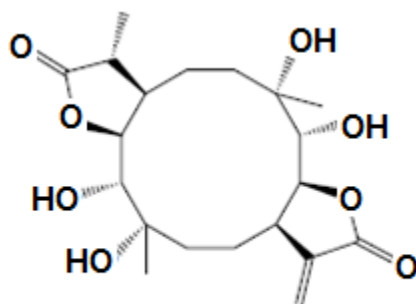
**Sintomatología:** El consumo de estos hongos crudos, en particular de *P. ostreatus*, produce lesión endotelial con edema en corazón y pulmones, así como hemorragias del miocardio. También hay hemorragias en el intestino y en otros tejidos. El examen histológico presentó cambios hepáticos patológicos (176, 177).

**Toxinas:** **Ostreolisina**, una proteína ácida de 15 kDa, termolábil, se obtuvo de carpóforos de *Pleurotus ostreatus* (178). Es una **citolisina tóxica** que lisa eritrocitos bovinos, ovinos y humanos *in vitro* y probablemente también tienen efectos similares *in vivo*, como lo indica el aumento de potasio en suero (179). Se estudiaron sus propiedades tóxicas en roedores y la DL<sub>50</sub> en ratones fue de 1170 µg/kg (178-180). En 2004, se aisló y caracterizó de *P. ostreatus* una citolisina formadora de poros, **pleurotolisina**, que consiste en dos componentes no asociados, **pleurolisina A** de 17 kDa y **pleurolisina B** de 52 kDa (181). Cooperativamente, estos dos componentes causan la salida de iones potasio de los eritrocitos humanos y edema pronunciado que conduce a hemólisis (181). Una **lectina dimérica** de 32,4 kDa también se ha aislado de *P. citrinopileatus* (182), con alta actividad de hemaglutinación y estabilidad hasta 60°C. También, una hemolisina monomérica, designada **eringeolisina** de 17 kDa se aisló de carpóforos de *P. eryngii*, que presentó similitud estructural con la ostreolisina de *P. ostreatus*. Resultó estable en el rango de pH 4,0-12,0, pero sólo hasta 30°C (183). Más recientemente, se obtuvo de *P. eryngii* una hemolisina termoestable de dos componentes: **erilisina A** (15 kDa; homodímero) y **erilisina B** [52 kDa; heterodímero de B<sub>1</sub> (15 kDa) y B<sub>2</sub> (37 kDa)] (184). **Erilisina** (A y B) es similar a pleurotolisina (A y B) obtenida de *P. ostreatus* (181). Ambas hemolisinas requieren la coexistencia de las unidades A y B para exhibir una actividad fuerte. La falta de registros de intoxicaciones después del consumo de estas especies de *Pleurotus* completamente cocidas, indica que durante la cocción y/o digestión se elimina cualquier efecto tóxico de las citolisinas. Si bien se sabe que algunas otras lectinas en ciertos alimentos pueden causar efectos gastrointestinales. Además se identificaron pequeñas cantidades de **cianuro de hidrógeno** en *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus* (161) y en *P. eryngii* (185). Durante la cocción el compuesto cianogénico es destruido casi completamente y, en consecuencia, no implica riesgo alguno para la salud de los consumidores. Así, al cocinar en agua a 95°C durante 6 minutos los carpóforos de *P. eryngii* cortados en rodajas, se

perdió el 89% del cianuro de hidrógeno original (185).

*P. ostreatus* contiene una serie de **compuestos indólicos simples**, biológicamente activos (**5-hidroxitriptofano**, **serotonina** y **triptamina**) (186) que por ebullición de los carpóforos cambian significativamente, ya que 5-hidroxitriptofano y serotonina se descomponen y forman **triptofano** y **5-metiltriptofano**. Algunos de estos componentes son hormonas tisulares y neurotransmisores; altas ingestas de triptofano pueden dañar al sistema nervioso (187). *P. ostreatus* contiene pequeñas cantidades de **arabitol**, un glicitol que puede causar malestar gastrointestinal en algunas personas. **Ergotioneína** y la estatina **lovastatina** se han encontrado en los carpóforos y en los micelios de *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus* y de *P. eryngii* (105). Por el proceso de cocción la lactona lovastatina puede hidrolizarse al ácido hidroxicarboxílico correspondiente, que es la forma activa hipolipidémica (188). Pero, las estatinas en ciertos casos causan miopatía, que se caracteriza por debilidad y/o dolor muscular y, en casos muy raros, rabdomiólisis (189).

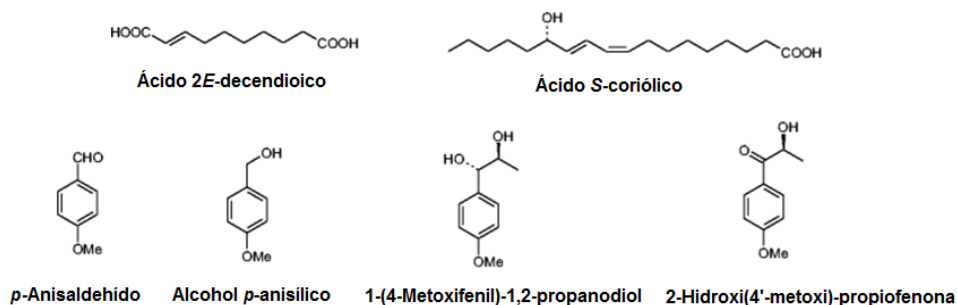
Se han aislado e identificado tres **lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas** bioactivas a partir de un cultivo sólido de *P. eryngii*: **eringiólido A**, **1,2-dihidroxi- $\alpha,\beta$ -lactona** y **5-hidroxi-3,4,5-trimetilfuran-2(5H)-ona**. Se considera que la estructura de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada es un alerta estructural de genotoxicidad. Sólo **eringiólido A** (Fig. 26) mostró toxicidad contra las líneas celulares de cáncer humano, HeLa y HepG2 (190). Eringiólido A es un diterpenoide con un esqueleto de ciclododecano sustituido y fusionado con dos grupos lactona.



**Eringiólido A**

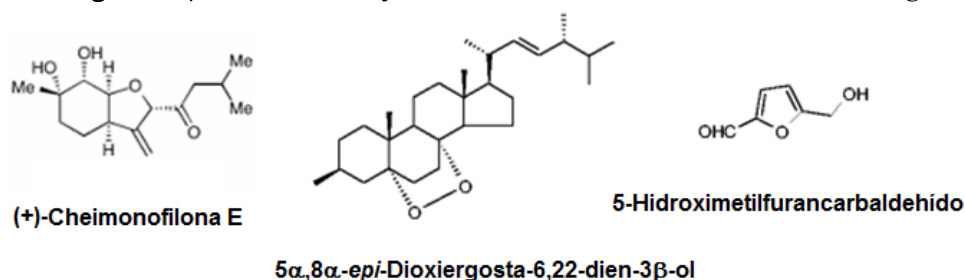
**Figura 26:** Estructura química de eringiólido A.

Otra lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, **pleurona (4H-1,3-dioxin-2,4-diona)** ha sido aislada de carpóforos de *P. eryngii* var. *ferulae*, que resultó ser un inhibidor moderado *in vitro* de elastasa de neutrófilos humanos (191). Recientemente también se obtuvieron **ergostanos** de *P. eryngii* (192). *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* y *P. eryngii* y sus variedades son representantes de los pocos basidiomicetos carnívoros conocidos, ya que sus micelios pueden matar y digerir nematodos, que es la manera que tienen estos hongos de obtener nitrógeno. *P. ostreatus* secreta diminutas gotitas que contienen toxinas, que paralizan a un nematodo sin matarlo en 30 segundos de contacto, luego la presa es penetrada por las hifas tróficas del hongo y digerida en 24 horas (108). El primer nematocida obtenido de *P. ostreatus* fue el **ácido 2E-decendioico** (Fig. 27). El ácido (*S*)-(9*Z*,11*E*)-13-hidroxi-9,11-octadecadienoico (o **ácido S-coriólico**) (Fig. 27) y el **ácido linoleico** se aislaron de *P. pulmonarius* y presentaron una muy potente actividad nematocida. También se obtuvieron **p-anisalaldehído**, **alcohol p-anisílico**, **1-(4-metoxifenil)-1,2-propanodiol** y **2-hidroxi(4'-metoxi)-propiofenona** (Fig. 27) algo menos activos, de *P. pulmonarius* (193).



**Figura 27:** Estructuras químicas de ácido 2*E*-decendioico, ácido *S*-coriólico, *p*-anisaldehído, alcohol *p*-anisílico, 1-(4-metoxifenil)-1,2-propanodiol y 2-hidroxi(4'-metoxi)-propiofenona.

Se aislaron tres compuestos nematocidas de *P. eryngii* var. *ferulae*: **Cheimonofilona E**, **5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epi-dioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol** y **5-hidroximetil-furancarbaldehído** (Fig. 28) (194).



**Figura 28:** Estructuras químicas de cheimonofilona E, 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epi-dioxiergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol y 5-hidroximetil-furancarbaldehído.

**Mecanismo de acción:** Los efectos tóxicos y letales de extractos de *P. ostreatus* crudos y de ostreolisina se estudiaron en roedores. La administración oral o intraperitoneal de hasta 1000 mg del extracto de *P. ostreatus*/kg de peso corporal/día en ratones durante 30 días produjo hemorragias en el intestino y en otros tejidos. Los principales hallazgos histológicos fueron cambios hepáticos patológicos, pero de una manera no dependiente de la dosis (176). El electrocardiograma, la presión arterial y la actividad respiratoria se registraron bajo anestesia general, en ratas intactas, farmacológicamente vagotomizadas y con respiración artificial inyectadas con una DL<sub>50</sub> de ratón. Unos pocos segundos después de la inyección intravenosa de **ostreolisina** se registró un aumento transitorio de la presión arterial, seguido de una caída progresiva a la presión media circulatoria acompañada de bradicardia, isquemia miocárdica y extrasístoles ventriculares (179).

Ostreolisina indujo lisis de los eritrocitos de rata *in vitro*, y probablemente también *in vivo* como lo indica el aumento de potasio sérico. Si bien no se puede excluir la acción directa de la proteína sobre los cardiomiocitos o la circulación cardíaca, la hiperpotasemia resultante de la actividad hemolítica probablemente desempeña un papel importante en su toxicidad (179). La letalidad y la acción tóxica cardiorrespiratoria de ostreolisina pueden explicar los efectos adversos registrados por consumo de *P. ostreatus* crudo.

Después de la aplicación parenteral de ostreolisina a ratas se pudo demostrar lesión endotelial con edema en corazón y pulmones, así como hemorragias del miocardio (177).

**Especie causante del micetismo:** División: *Basidiomycota*, Clase: *Agaricomycetes*, Orden: *Agaricales*, Familia: *Pleurotaeae*: ***Pleurotus ostreatus*** (Jacq.: Fr.) P. Kumm. es un hongo saprotrófico, que crece en grupos sobre troncos de bosques caducos vivos y muertos, raramente en coníferas, en bosques templados y subtropicales de todo el mundo, también en zonas templadas de Europa y en regiones subárticas/subalpinas de los países nórdicos de Europa (110). No se encuentra en el noroeste de América del Norte, donde es reemplazado por *P. pulmonarius*. Se cultiva en muchas partes del mundo. *P. ostreatus* crece en la Patagonia Argentina sobre troncos de *Araucaria araucana*, un árbol nativo poco utilizado por los hongos para desarrollarse (195). Los ensayos de compatibilidad confirmaron que en Argentina hay, hasta ahora, cinco especies de *Pleurotus*: *P. albidus* (Berk.) Pegler, *P.*

*cystidiosus* O.K. Mill.[Sin.: *P. smithii*Guzman], *P. djamor* (Rumph.: Fr.) Boedijn., *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm.y *P. pulmonarius*(Fr.: Fr.) Quél. (196). *P. djamor* con tres variedades: var. *djamor*, var. *cyathiformis* y var. *roseus* (197); ***Pleurotus citrinopileatus***Singer es un hongo saprotrófico que crece en forma silvestre en bosques de hoja caduca en Japón y el lejano este de Rusia (198); ***Pleurotus eryngii***(DC.) Quél. (“Ostra Rey”, “King Oyster”) [*P. eryngii* var. *ferulae* (Lanzi) Sacc.] es un hongo saprotrófico que crece en hierbas Umbelíferas altas muertas y también en vivas/moribundas, en áreas abiertas parecidas a estepas, en forma silvestre en el área Mediterránea y hacia el este en China y Asia Central (198).

### 3. Tratamientos

**Tratamiento del toxíndrome muscarínico o sudoriano:** Este es el único síndrome que tiene un antídoto específico, la atropina, que se administra por vía intravenosa (4).

El carbón activado se puede usar para el tratamiento (0,5-1 g/kg de peso corporal), para retrasar la captación de la toxina muscarina. Dado que cuadros de toxicidad grave y de muerte son poco comunes, el tratamiento de la intoxicación con muscarina es principalmente de apoyo con rehidratación líquida y control de la secreción con atropina intravenosa, 0,01-0,02 mg/kg.

**Tratamiento del síndrome paxiliano:** El tratamiento del síndrome de *Paxillus* es totalmente de apoyo e incluye hemoperfusión o hemodiálisis, y la muerte es rara (10, 11). Se usa la terapia por intercambio de plasma(11). Un paciente de 37 años enfermó gravemente después de la ingestión reiterada de *Paxillus involutus* suficientemente cocidos. Como resultado de la hemólisis con síntomas reversibles de shock, desarrolló insuficiencia renal aguda. El intercambio de plasma con 3.000 ml de albúmina al 5% se llevó a cabo diariamente durante los primeros 3 días después del ingreso. Cada intercambio de plasma disminuyó la hemoglobina libre y los niveles del complejo inmune en un 60-75%. La insuficiencia renal aguda se trató con éxito con hemodiálisis (11).

**Tratamiento de la licoperdonosis:** La licoperdonosis generalmente se trata con corticosteroides, que disminuyen la respuesta inflamatoria; a veces se administran junto con antimicrobianos (20, 28). Los esteroides a menudo exacerban las infecciones fúngicas, sin embargo, en la mayoría de los casos descritos, la mejora respiratoria se logró después de la administración de corticosteroides (20, 21, 28, 46). La efectividad de los esteroides es muy respaldatoria de la teoría de que la licoperdonosis representa una reacción de hipersensibilidad; sin embargo, en algunos de estos casos, también se administraron antifúngicos (20). De hecho, la germinación de los elementos fúngicos nunca se ha reportado *in vivo* y, debido a las temperaturas corporales cálidas, no se cree que ocurra (28), lo que confirma aún más la probabilidad de que la licoperdonosis no represente una infección fúngica activa.

**Tratamiento del toxíndrome panterínico o síndrome *pantherinal/muscaria*:** El tratamiento es sólo sintomático, y el pronóstico generalmente es bueno. La recuperación es rápida y completa en todos los pacientes. Si transcurrieran menos de cuatro horas después de la ingestión de *A. muscaria*, se puede usar carbón activado para eliminar los hongos del tracto digestivo lo más rápidamente posible y detener así la captación del ácido iboténico y del muscimol, evitando una mayor intoxicación. Simultáneamente se deben controlar los signos vitales del paciente; la toxicidad suele durar entre 6 y 8 horas; sin embargo, algunos síntomas pueden tardar hasta unos días en desaparecer. Si el tratamiento ocurre dentro de la primera hora de la ingestión, el lavado gástrico puede ser efectivo. A veces, se administrarán benzodiazepinas para controlar los ataques de pánico y las alucinaciones. En el estado comatoso, es importante controlar la respiración y la circulación. Si los vómitos se vuelven demasiado intensos, se pueden administrar fluidos por vía intravenosa. Si se observan síntomas de síndrome muscarínico al inicio de la intoxicación, se deben administrar pequeñas dosis de fármacos anticolinérgicos, como atropina por vía subcutánea (61, 65).

**Tratamiento del toxisíndrome alucinogénico por compuestos indólicos:** Rara vez se requiere intervención terapéutica en adultos. Los síntomas de intoxicación pueden disminuir



naturalmente; con una **evolución espontáneamente favorable en 12 a 48 horas. En los casos graves se requiere internación en reanimación.**

**El tratamiento es sintomático (reposo, sedantes, monitoreo)**, sin embargo, la aplicación de fenotiazina o diazepam puede ser necesaria en algunos casos. Las benzodiazepinas y los barbitúricos se han usado para controlar la agitación y las convulsiones.

**Tratamiento de la rabdomiólisis causada por *Russula subnigricans*:** El tratamiento para la rabdomiólisis en el caso de micetismo es principalmente de apoyo; no existe un antídoto específico. Los principales factores que determinan la supervivencia son la cantidad de hongos ingeridos y la rapidez con que comienza el tratamiento después de la ingestión. En la rabdomiólisis se produce daño renal inducido por la mioglobina circulante después de la ruptura de las células musculares, por lo que hay que implementar estrategias terapéuticas para reemplazar la función renal defectuosa y medidas preventivas para evitar un mayor daño debido a obstrucción tubular renal, alteración de la hemodinámica intrarrenal y disfunción de las células tubulares. Actualmente se usan como medidas de protección renal la expansión del volumen intravascular mediante fluidos alcalinos y la diuresis forzada mediante diuréticos osmóticos, pero no son útiles en el contexto de la oliguria grave. La insuficiencia renal aguda se trata con terapias de reemplazo renal clásicas. También es importante remover la mioglobina circulante, para lo cual las técnicas extracorpóreas resultan poco efectivas por varias razones que dependen de la naturaleza del compuesto mioglobina, su distribución en el organismo, el mecanismo de transporte y la estructura de la membrana utilizada en la técnica extracorpórea. La mioglobina tiene una masa molecular de 17 kDa, pero debido a que no es esférica y lleva cargas eléctricas, puede ser considerada un soluto con un radio de Einstein-Stokes mayor de lo esperado. Por lo tanto, no sólo tiene un coeficiente de difusión muy bajo, por lo que requiere transporte por convección, sino que también posee una magnitud estérica que es probable que sea rechazada por los poros de la membrana. Los intentos previos para remover la mioglobina mediante intercambio de plasma, hemodiálisis intermitente y las terapias continuas de reemplazo renal (CRRT: *continuous renal replacement therapies*) lamentablemente han tenido un éxito limitado. Se utilizó el **clearance de mioglobina mediante hemofiltración continua** utilizando una **membrana de "flujo super-alto"** en un caso de rabdomiólisis aguda (199) brindando un reemplazo renal eficiente y remoción rápida de la mioglobina circulante. Esta técnica continua con una membrana hiperpermeable permite un clearance de mioglobina significativamente mayor que el tratamiento control con una membrana estándar de alto flujo. No obstante, una posible limitación es la pérdida de albúmina. En el caso de pérdidas excesivas de albúmina, la terapia de pulso de flujo súper alto podría usarse junto con **hemofiltración veno-venosa continua** (CVVH: *continuous veno-venous hemofiltration*) estándar durante unas pocas horas cada día como un compromiso entre los efectos beneficiosos de la remoción de mioglobina y los efectos negativos de las pérdidas excesivas de albúmina en los tratamientos continuos. La disponibilidad comercial de tales membranas nuevas en la práctica diaria permitirá la aplicación clínica de las técnicas de hemofiltración de flujo súper alto. Otra opción para la remoción de mioglobina en el tratamiento de la rabdomiólisis es el uso de un sorbente polimérico que puede usarse tanto en **hemoperfusión** como en combinación con **terapias continuas de reemplazorenal** tradicionales. Se ha utilizado un nuevo adsorbente, CytoSorb™ (CytoSorbents Corp) en hemoperfusión durante 12 horas para remover mioglobina de la sangre en una situación compleja de rabdomiólisis asociada con neumonía por *Legionella* (200). CytoSorb™ es un polímero poroso biocompatible con alta capacidad de unión y diseñado para disminuir los niveles tóxicos de mediadores pro- y anti-inflamatorios, mioglobina y bilirrubina directamente de la sangre. Además, en un paciente con rabdomiólisis grave e insuficiencia renal aguda, después de una gastrectomía en mangalaparoscópica, el cartucho se usó durante 24 horas y se instaló en serie después del dializador en el circuito de terapia continua de reemplazo renal (201). Los resultados, antes y después del tratamiento, demostraron una disminución importante de los niveles de mioglobina (disminución en HP: 54,6%; CRRT + HP: 83,3%) y una mejora en la función renal tanto en la hemoperfusión

(HP) independiente, como en combinación con terapias continuas de reemplazo renal (CRRT). El uso de nuevos sorbentes en la filtración veno-venosa continua y hemoperfusión podría representar un enfoque novedoso para el tratamiento de la rabdomiólisis aguda.

**Tratamiento de la intoxicación con *Podostroma cornu-damae*:** El tratamiento incluye cuidados de apoyo, antibióticos para cubrir la fiebre neutropénica y factor estimulante de colonias de granulocitos para la pancitopenia (168). La plasmaféresis y la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos se usaron para tratar los trastornos sanguíneos. Estos tratamientos, además del gran volumen de líquido intravenoso, 9 litros durante un período de 12 horas, administrado por vía intravenosa desde el día siguiente de ingerir el hongo tóxico, fueron los responsables de la recuperación exitosa de pacientes muy graves (171). Mediante la transfusión de plaquetas, los pacientes pueden ser rescatados (168). Es importante infundir grandes cantidades de fluidos en el tratamiento inicial de la intoxicación por *Podostroma cornu-damae*, y la terapia de purificación de la sangre (hemodiafiltración continua e intercambio de plasma) es muy recomendable.

#### 4. Conclusiones.

En esta Parte 4 de esta serie de cuatro artículos sobre micetismos se han analizado gran parte de los síndromes tempranos, con períodos de latencia menores a 6 horas, que presentan síntomas complejos. Por supuesto que quedan por analizar algunos síndromes menos conocidos y menos relevantes por la cantidad de intoxicados involucrados; pero en esta serie se han discutido un número destacado de micetismos y con cierta profundidad de análisis. Si bien en estos cuatro artículos se han enfatizados los aspectos tóxicos y letales de la ingestión de hongos superiores, los autores desean señalar que se conocen una gran variedad de Macromicetos comestibles y con capacidad curativa que se han utilizado en distintas comunidades desde la antigüedad, pero que no han sido el objetivo de estos trabajos. En cuanto a los tratamientos para los micetismos presentados se debe enfatizar la importancia de realizar un diagnóstico rápido y preciso en el centro médico y la identificación de los carpóforos por servicios micológicos especializados. Como ya se ha indicado en los artículos anteriores, en la Ciudad de Buenos Aires (Argentina) funciona el “Servicio de Identificación de Hongos Tóxicos”, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA; Pabellón 2, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental), con micólogos investigadores que colaboran con servicios médicos, estatales y privados, identificando los hongos en casos de micetismos, para que se pueda realizar el tratamiento médico adecuado (202).

**Agradecimientos:** Al Hospital de Clínicas y a la Universidad de Buenos Aires por la infraestructura brindada; al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (Mincyt, Argentina) por las facilidades de acceso a la biblioteca electrónica. A.B.P. es Investigadora Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

#### Referencias:

1. Pomilio AB, Battista SM, Alonso A. Micetismos. Parte 1: Síndromes con período de latencia tardía. *Acta Bioq Clin Latinoamer*, 2018, en revisión.
2. Pomilio AB, Battista SM, Alonso A. Micetismos. Parte 2: Síndromes con sintomatología demorada y latencia muy larga. *Acta Bioquim Clin Latinoamer* 2018; en revisión.
3. Pomilio AB, Battista SM, Alonso A. Micetismos. Parte 3: Síndromes tempranos gastrointestinales. *Acta Bioquim Clin Latinoamer* 2018; enviado.
4. Diaz JH. Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings. *Crit Care Med* 2005; 33 (2): 427-36.
5. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine Agaricales 4. Tricholomataceae and Polyporaceae. *Mycotaxon* 2012; 121: 499-500.
6. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine Agaricales 7. Cortinariaceae and Entolomataceae. *Check List* 2014; 10 (1): 72-96.
7. Raithelhuber J. *Nueva Flora Micológica Argentina*. Mycosur, Stuttgart, 2004.
8. Albertó E. El género *Agaricus* en la Provincia de Buenos Aires: I (Argentina). Secciones *Agaricus* y *Sanguinolenti*. *Bol Soc Micol Madrid* 1996; 21: 127-44.



9. Wright JE, Albertó E. *Guía de hongos de la región pampeana. I. Hongos con laminillas*. Editorial L.O.L.A., Buenos Aires, 2002.
10. Flammer R. [*Paxillus* syndrome: immunohemolysis following repeated mushroom ingestion]. Artículo en idioma alemán. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1985; 74 (37): 997-9.
11. Winkelmann M, Stangel W, Schedel I, Grabensee B. Severe hemolysis caused by antibodies against the mushroom *Paxillus involutus* and its therapy by plasma exchange. *Klin Wochenschr* 1986; 64 (19): 935-8.
12. Edwards RL, Elsworthy GC, Kale N. Constituents of the higher fungi. Part IV. Involutin, a diphenylcyclopenteneone from *Paxillus involutus* (Oeder ex Fries). *J Chem Soc C* 1967; 405-9.
13. Feling R, Polborn K, Steglich W, Mühlbacher J, Bringmann G. The absolute configuration of the mushroom metabolites involutin and chamonixin. *Tetrahedron* 2001; 57 (37): 7857-63. Feling R, Polborn K, Steglich W, Mühlbacher J, Bringmann G. Corrigendum. *Tetrahedron* 2001; 57 (51): 10231.
14. Bresinsky A, Besl H. *A Colour Atlas of Poisonous Fungi: a Handbook for Pharmacists, Doctors, and Biologists*. 1a ed, Wolfe Publishing Ltd., London, 1990.
15. Antkowiak R, Antkowiak WZ, Banczyk I, Mikolajczyk L. A new phenolic metabolite, involutone, isolated from the mushroom *Paxillus involutus*. *Can J Chem* 2003; 81 (1): 118-24.
16. Zhou Z-Y, Liu J-K. Pigments of fungi (Macromycetes). *Nat Prod Rep* 2010; 27: 1531-70.
17. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentinean Agaricales 6. *Paxillaceae, Gomphidiaceae, Boletaceae* and *Russulaceae*. *Mycotaxon* 2013; 123: 491.
18. Kruger D, Binder M, Fischer M, Kreisel H. The *Lycoperdales*: a molecular approach to the systematics of some gasteroid mushrooms. *Mycologia* 2001; 93 (5): 947-57.
19. Larsson E, Jeppson M. Phylogenetic relationships among species and genera of *Lycoperdaceae* based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycol Res* 2008; 112 (Pt 1): 4-22.
20. Taft TA, Cardillo RC, Letzer D, Kaufman CT, Kazmierczak JJ, Davis JP. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Respiratory illness associated with inhalation of mushroom spores - Wisconsin, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994; 43 (29): 525-6.
21. Rubensohn M. Inhalation pneumonitis in a dog from spores of puffball mushrooms. *Can Vet J* 2009; 50 (1): 93.
22. Alenghat T, Pillitteri CA, Bemis DA, Kellett-Gregory L, Jackson KV, Kania SA, et al. *Lycoperdonosis* in two dogs. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22 (6): 1002-5.
23. Buckeridge D, Torrance A, Daly M. Puffball mushroom toxicosis (*lycoperdonosis*) in a two-year-old dachshund. *Vet Rec* 2011; 168 (11): 304.
24. Bates ST, Papinutti L Fungi of Argentina: gasteroid and secotioid taxa. Agaricaceae. *Mycology Collections Portal*. <http://mycoportal.org/portal/checklists/checklist.php?cl=31>  
Fecha de acceso: 7 de setiembre de 2018.
25. Lemin M, Vasquez A, Chacon S. *Etnomicología y comercialización de hongos en mercados de tres poblados del noreste del estado de Puebla, México*. *Brenesia* 2010; (73/74): 58-63.
26. Papinutti L. *Morganella sulcastoma* en Argentina. *Bol Soc Argent Bot* 2014; 49 (2): 173-6.
27. Nakazawa T, Tochigi T. Hypersensitivity pneumonitis due to mushroom (*Pholiota nameko*) spores. *Chest* 1989; 95 (5): 1149-51.
28. Munson EL, Panko DM, Fink JG. *Lycoperdonosis: Report of two cases and discussion of the disease*. *Clin Microbiol Newsl* 1997; 19 (3): 17-24.
29. Peroš-Golubičić T, Sharma OP. Hypersensitivity pneumonitis. En: *Clinical Atlas of Interstitial Lung Disease*. Springer. 2006; pp. 91-5.
30. Girard M, Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 2009; 64 (3): 322-34.
31. Geiser M, Leupin N, Maye I, Hof VI, Gehr P. Interaction of fungal spores with the lungs: distribution and retention of inhaled puffball (*Calvatia excipuliformis*) spores. *J*

*Allergy Clin Immunol* 2000; 106 (1 Pt 1): 92-100.

32. Geiser M, Schurch S, Gehr P. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *J Appl Physiol* 2003; 94 (5):1793-801.

33. Moore JE, Convery RP, Millar BC, Rao JR, Elborn JS. Hypersensitivity pneumonitis associated with mushroom worker's lung: An update on the clinical significance of the importation of exotic mushroom varieties. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136 (1): 98-102.

34. Almendros G, Martín F, González-Vila FJ, Martínez AT. Melanins and lipids in *Lycoperdon perlatum* fruit bodies. *Trans Br Mycol Soc* 1987; 89 (4): 533-7.

35. Nedelcheva D, Antonova D, Tsvetkova S, Marekov I, Momchilova S, Nikolova-Damyanova B, et al. TLC and GC-MS probes into the fatty acid composition of some Lycoperdaceae mushrooms. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 2007; 30 (18): 2717-27.

36. Barros L, Dueñas M, Ferreira ICFR, Baptista P, Santos-Buelga C. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem Toxicol* 2009; 47 (6): 1076-9.

37. Szummy A, Adamski M, Winska K, Maczka W. Identyfikacja związków steroidowych i olejków eterycznych z *Lycoperdon perlatum*. [Identification of steroid compounds and essential oils from *Lycoperdon perlatum*]. Artículo en idioma polaco. *Przemysł Chemiczny* 2010; 89 (4): 550-3.

38. Ramesh C, Pattar MG. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Res* 2010; 2 (2): 107-12.

39. Dulger B. Antimicrobial activity of ten Lycoperdaceae. *Fitoterapia* 2005; 76 (3-4): 352-4.

40. Pujol V, Seux V, Villard J. Research of antifungal substances produced by higher fungi in culture. *Ann Pharm Fr* 1990; 48 (1): 17-22.

41. Lamotte JL, Oleksyn B, Dupont L, Dideberg O, Campsteyn H, Vermiere M. The crystal and molecular structure of 3-[(5*S*)-5-carboxy-2-oxotetrahydrofuran-5-yl]-(2*S*)-alanine (lycoperdic acid). *Acta Crystallogr B* 1978; 34 (12): 3635-8.

42. Falandyś J, Lipka K, Kawano M, Brzostowski A, Dadej M, Jedrusiak A, et al. Mercury content and its bioconcentration factors in wild mushrooms at Łukta and Morąg, northeastern Poland. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (9): 2832-6.

43. Quince J-P. *Lycoperdon perlatum*, un champignon accumulateur de métaux lourds et de selenium. [*Lycoperdon perlatum* a fungus accumulating heavy metals and selenium]. *Mycol Helv* 1990; 3 (4): 477-86.

44. Sari A, Tuzen M, Citak D. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies on biosorption of mercury from aqueous solution by macrofungus (*Lycoperdon perlatum*) biomass. *Sep Sci Technol* 2012; 47 (8): 1167-76.

45. Strand RD, Neuhauser EB, Somberger CF. *Lycoperdonosis*. *N Engl J Med* 1967; 277 (2): 89-91.

46. Henriksen NT. *Lycoperdonosis*. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65 (5): 643-5.

47. Læssøe T, Pegler DN, Spooner B. *British Puffballs, Earthstars and Stinkhorns: An Account of the British Gasteroid Fungi*. Kew, UK: Royal Botanic Gardens.1995; p. 152.

48. Kasuya T. *Gasteromycetes of Chiba Prefecture, Central Honshu, Japan - I. The family Lycoperdaceae*. *J Nat Hist Mus Inst Chiba* 2004; 8 (1): 1-11.

49. Natarajan K, Purushothama KB. On the occurrence of *Lycoperdon perlatum* in *Pinus patula* plantations in Tamil Nadu. *Curr Sci* 1987; 56 (21): 1117-8.

50. Moreno G, Lizárraga M, Esqueda M, Coronado ML. Contribution to the study of gasteroid and secotioid fungi of Chihuahua, Mexico. *Mycotaxon* 2010; 112: 291-315.

51. Baseia UG. Some notes on the genera *Bovista* and *Lycoperdon* (Lycoperdaceae) in Brazil. *Mycotaxon* 2005; 91: 81-6.

52. Hongo polvera en la Patagonia. Accesible en: [http://www.patagonia-argentina.photo/foto\\_tag/lycoperdon/](http://www.patagonia-argentina.photo/foto_tag/lycoperdon/). Fecha de acceso: 3 de septiembre de 2018.

53. Jeppson M. The genus *Lycoperdon* in Greenland and Svalbard. En: Boertmann D, Knudsen H. *Arctic and Alpine Mycology*. Meddelelser om Grønland Bioscience. 6.

- Copenhagen, Denmark: Museum Tusculanum Press. 2006; p. 106.
54. Moss MO. Gasteroid Basidiomycetes on postage stamps. *Mycologist* 1998; 12 (3): 104-6.
  55. Vizzini A, Ercole E. Detecting the phylogenetic position of *Bovista acuminata* (Agaricales, Basidiomycota) by an ITS-LSU combined analysis: the new genus *Bryoperdon* and revisitation of *Lycoperdon* subgen. *Apioperdon*. *Phytotaxa* 2017; 299 (1): 77-86.
  56. Wright JE, Wright A. Checklist of the mycobiota of Iguazú National Park (Misiones, Argentina). *Bol Soc Argent Bot* 2005; 40: 23-44.
  57. Wright JE, Lechner BE, Popoff OF. Hongos. *Atlas pictórico del Parque Nacional Iguazú*. Editorial L.O.L.A., Buenos Aires, 2008.
  58. Hernández-Caffot ML, Robledo G, Domínguez LS. Gasteroid mycobiota (Basidiomycota) from *Polylepis australis* woodlands of central Argentina. *Mycotaxon* 2013; 123: 491.
  59. Dios MM, Albertó E, Moreno G. Catálogo de hongos gasteroides (Basidiomycota) de Catamarca, Argentina. *Bol Soc Argent Bot* 2011; 46: 5-11.
  60. Dios MM, Moreno G, Zamora JC, Altés A. Algunos hongos gasteroides epigeos interesantes de Catamarca (Argentina). *Lilloa* 2017; 54 (2): 154-69.
  61. Patočka J, Kocandrlová B. Pharmacologically and toxicologically relevant components of *Amanita muscaria*. *Mil Med Sci Lett (Voj Zdrav Listy)* 2017; 86(3): 122-34.
  62. Piqueras Carrasco J. *Intoxicaciones por plantas y hongos*. Editorial Masson, Barcelona, 1996.
  63. Vendramin A, Brvar M. *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* poisoning: two syndromes. *Toxicol* 2014; 90: 269-72.
  64. Moss MJ, Hendrickson RG. Toxicity of muscimol and ibotenic acid containing mushrooms reported to a regional poison control center from 2002–2016. *Clin Toxicol* 2018; 1-5.
  65. Michelot D, Melendez-Howell LM. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycol Res* 2003; 107 (Pt 2): 131-46.
  66. Chilton WS, Ott J. Toxic metabolites of *Amanita pantherina*, *A. cothurnata*, *A. muscaria* and other *Amanita* species. *Lloydia* 1976; 39 (2-3): 150-7.
  67. Gordeeva OV. Psychological effects of *Amanita muscaria*. *Siberian Historical Res* 2017; (2): 152-83.
  68. Rubel W, Arora D. A study of cultural bias in field guide determinations of mushroom edibility using the iconic mushroom, *Amanita muscaria*, as an example. *Econ Bot* 2008; 62 (3): 223-43.
  69. Garner CD, Armstrong EM, Berry RE, Beddoes RL, Collison D, Cooney JJ, et al. Investigations of Amavadin. *J Inorg Biochem* 2000; 80 (1-2): 17-20.
  70. Hubregtse T, Neeleman E, Maschmeyer T, Sheldon RA, Hanefeld U, Arends IWCE. The first enantioselective synthesis of the amavadin ligand and its complexation to vanadium. *J Inorg Biochem* 2005; 99 (5): 1264-7.
  71. Lipka K, Falandysz J. Accumulation of metallic elements by *Amanita muscaria* from rural lowland and industrial upland regions. *J Environ Sci Health B* 2017; 52 (3): 184-90.
  72. Mędyk M, Grembecka M, Brzezicha-Cirocka J, Falandysz J. Bio- and toxic elements in mushrooms from the city of Umea and outskirts, Sweden. *J Environ Sci Health B* 2017; 11: 1-7.
  73. Liu J-K. N-Containing compounds of Macromycetes. *Chem Rev* 2005; 105 (7): 2723-44.
  74. Stadelmann RJ, Müller E, Eugster CH. Muscarine (Muscarin, *epi* und *allo*-Muscarin) aus dem Mycel von *Amanita muscaria* und von *Clitocybe*-Arten. *Sydowia* 1976; 29: 15-27.
  75. Stintzing F, Schliemann W. Pigments of fly agaric (*Amanita muscaria*). *Z Naturforsch C* 2007; 62 (11-12): 779-85.
  76. Depovere P, Moens P. Active principles and pigments of the fly agaric *Amanita* (*Amanita muscaria* (Fries) Hooker). *J Pharm Belg* 1984; 39 (4): 238-42.
  77. Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P, Madsen U. [Textbook of Drug Design and Discovery, Third Edition](#). CRC Press. 2002; pp. 263–.
  78. Ji C, Li Q, Aisa H, Yang N, Dong YL, Liu YY, et al. Gossypium herbaceum extracts

- attenuate ibotenic acid-induced excitotoxicity in rat hippocampus. *J Alzheimers Dis* 2009; 16 (2): 331-9.
79. Becker A, Grecksch G, Bernstein HG, Höllt V, Bogerts B. Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 144 (4): 333-8.
80. Sureda FX. ["Excitotoxicity and the NMDA receptor".http://www.eurosiva.org/archive/vienna/abstracts/speakers/sureda.htm](http://www.eurosiva.org/archive/vienna/abstracts/speakers/sureda.htm)
81. Kathrick C, Periyasami S, Jayachandran KS, Anusuyadevi M. Intrahippocampal administration of ibotenic acid induced cholinergic dysfunction via NR2A/NR2B expression: Implications of resveratrol against Alzheimer disease pathophysiology. *Front Mol Neurosci* 2016; 9 (28): 1-16.
82. Johnston GA. Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist. *Neurochem Res* 2014; 39 (10): 1942-7.
83. Walton JC, McNeill JK 4th, Oliver KA, Albers HE. Temporal regulation of GABA(A) receptor subunit expression: role in synaptic and extrasynaptic communication in the suprachiasmatic nucleus. *eNeuro* 2017; 4 (2). pii: ENEURO.0352-16.2017.
84. Nielsen EO, Schousboe A, Hansen SH, Krogsgaard-Larsen P. Excitatory amino acid: studies on the biochemical and chemical stability of ibotenic acid and related compounds. *J Neurochem* 1985; 45: 725-31.
85. Ishida M, Shinozaki H. Excitatory action of a plant extract, stizolobic acid, in the isolated spinal cord of the rat. *Brain Res* 1988; 473 (1): 193-7.
86. Shinozaki H, Ishida M. Stizolobic acid, a competitive antagonist of the quisqualate-type receptor at the crayfish neuromuscular junction. *Brain Res* 1988; 451 (1-2): 353-6.
87. Wartchow F. O gênero *Amanita* (Fungi): Sistemática e distribuição no Brasil. *Pesqui Ensino Ciênc Exatas Nat* 2017; 1 (1): 28-44.
88. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 1. *Amanitaceae, Pluteaceae and Hygrophoraceae. Mycotaxon* 2012; 119: 493-4.
89. Pérez-Silva E, Esqueda M, Herrera T, Coronado M. 2006. Nuevos registros de Agaricales de Sonora. *Rev Mex Biodivers* 2006;77: 23-33.
90. Satora L, Pach D, Ciszowski K, Winnik L. Panther cap *Amanita pantherina* poisoning case report and review. *Toxicon* 2006; 47: 605-7.
91. Neville P, Poumarat S. *Amanitaceae, Amanita, Limacella & Torrendia*. Edizioni Candusso, Alassio, 2004.
92. Albertó E, Pire G, Franco MG. Presencia del hongo tóxico *Amanita gemmata* (Agaricales, Basidiomycetes) en la costa Bonaerense. *Bol Soc Argent Bot* 2002; 37: 13-7.
93. Gry J, Andersson C. *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. En: *Mushrooms traded as food*. Vol. II, sec. 2. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Dinamarca, 2014; 160-3.
94. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 2. *Coprinaceae and Strophariaceae. Mycotaxon* 2012; 120: 505.
95. Gry J, Andersson C. *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo (*Coprinus atramentarius* (Bull.) Fr.). En: *Mushrooms traded as food*. Vol. II, sec. 2. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Dinamarca, 2014; 153-9.
96. Michelot D. Poisoning by *Coprinus atramentarius*. *Nat Toxins* 1992; 1 (2): 73-80..
97. Beug MW. *2014 NAMA Toxicology Committee Report. North American mushroom Poisonings*. North American Mycological Association (NAMA). 2014. [https://www.namycology.org/2014\\_nama\\_toxicology\\_committee.php](https://www.namycology.org/2014_nama_toxicology_committee.php). Fecha de acceso: 21 de agosto de 2018.
98. O'Neil CE, Horner WE, Reed MA, Lopez M, Lehrer SB. Evaluation of Basidiomycete and Deuteromycete (Fungi Imperfecti) extracts for shared allergenic determinants. *Clin Exp Allergy* 1990; 20 (5): 533-8.
99. Lehrer SB, Hughes JM, Altman LC, Bousquet J, Davies RJ, Gell L, et al. Prevalence of basidiomycete allergy in the USA and Europe and its relationship to allergic respiratory symptoms. *Allergy* 1994; 49 (6): 460-5.
100. Lindberg P, Bergman R, Wickberg B. Isolation and structure of coprine, a novel



- physiologically active cyclopropanone derivative from *Coprinus atramentarius* and its synthesis via 1-aminocyclopropanol. *J Chem Soc, Chem Commun* 1975; (23): 946-7.
101. Hatfield GM, Schaumberg JP. Isolation and structural studies of coprine, the disufiram-like constituent of *Coprinus atramentarius*. *Lloydia* 1975; 38 (6): 489-96.
102. Lindberg P, Bergman R, Wickberg B. Isolation and structure of coprine, the *in-vivo* aldehyde dehydrogenase inhibitor in *Coprinus atramentarius*; syntheses of coprine and related cyclopropanone derivatives. *J Chem Soc Perkin 1* 1977; (6): 684-91.
103. Matthies L, Laatsch H. Ungewöhnliche Pilzvergiftungen: Coprin, ein Hemmstoff des Alkohol-Abbaus. *Pharm Unserer Zeit* 1992; 21 (1): 14-20.
104. Lee I-K, Jeong C-Y, Cho S-M, Yun B-S, Kim Y-S, Yu S-H, et al. Illudins C-2 and C-3, new illudin C derivatives from *Coprinus atramentarius*. *J Antibiotics* 1996; 49 (8): 821-2.
105. Chen S-Y, Ho K-J, Hsieh Y-J, Wang L-T, Mau J-L. Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT- Food Sci Technol* 2012; 47: 274-8.
106. Mikiashvili N, Elisashvili V, Wasser SP, Nevo E. Comparative study of lectin activity of higher basidiomycetes. *Int J Med Mushrooms* 2006; 8: 31-3.
107. Luo H, Liu Y, Fang L, Li X, Tang N, Zhang K. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 (12): 3916-23.
108. Degenkolb T, Vilcinskis A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100: 3813-24.
109. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* 2012; 16 (4): 667-85.
110. Gry J, Andersson C. *Mushrooms traded as food*. Vol. II, sec. 2. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Dinamarca, 2014.
111. Lee H, Kim SS, You KS, Park W, Yang JH, Kim M, et al. Asian flushing: genetic and sociocultural factors of alcoholism among east asians. *Gastroenterol Nurs* 2014; 37 (5): 327-36.
112. Jönsson M, Lindquist NG, Plöen L, Ekvärn S, Kronevi T. Testicular lesions of coprine and benzcoprine. *Toxicology* 1979; 12 (2): 89-100.
113. Lodge DJ, Padamsee M, Matheny PB, Aime MC, Cantrell SA, Boertmann D, et al. Molecular phylogeny, morphology, pigment chemistry and ecology in *Hygrophoraceae* (Agaricales). *Fungal Divers* 2014; 64 (1): 1-99.
114. Passie T, Seifert J, Schneider U, Emrich HM. The pharmacology of psilocybin. *Addict Biol* 2002; 7 (4): 357-64.
115. Stijve T, Kuyper TW. Occurrence of psilocybin in various higher fungi from several European countries. *Planta Med* 1985; 51 (5): 385-7.
116. Peredy T, Bradford H. Mushroom, Psilocybin. En: *Encyclopedia of Toxicology*. 3a ed, Reference Module in Biomedical Sciences, 2014; pp. 418-9.
117. Hossain MA, Park S-C. A Review on Mushroom Toxins. En: *Food Toxicology*. Chapter 14. 2016; 275-302.
118. Borowiak KS, Ciechanowski K, Waloszyk P. Psilocybin mushroom (*Psilocybe semilanceata*) intoxication with myocardial infarction. *J Toxicol Clin Toxicol* 1998; 36: 47-9.
119. Halberstadt AL, Koedood L, Powell SB, Geyer MA. Differential contributions of serotonin receptors to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens in mice. *J Psychopharmacol* 2011; 25 (11): 1548-61.
120. Araújo AM, Carvalho F, Bastos ML, Guedes de Pinho PG, Carvalho M. The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Arch Toxicol* 2015; 89 (8): 1151-73.
121. Vitale AA, Pomilio AB, Cañellas CO, Vitale MG, Putz EM, Ciprian-Ollivier JO. *In vivo* long-term kinetics of radiolabeled *N,N*-dimethyltryptamine and tryptamine. *J Nuclear Med* 2011; 52(6): 970-7.
122. Ciprian-Ollivier JO, Vitale AA, Pomilio AB. *Génesis neuroquímica molecular de las alucinaciones en la esquizofrenia. Implicancias clínicas*. Editorial Académica Española (es

- una marca comercial de: OmniScriptum GmbH & Co. KG, Bahnhofstrasse 28, 66111 Saarbrücken, Alemania). Noviembre 2015. ISBN: 978-3-659-09956-4.
123. Vitale AA, Ciprian-Ollivier J, Vitale MG, Romero E, Pomilio AB. Estudio clínico de marcadores de la hipermetilación indólica en las alteraciones de la percepción. *Acta Bioquim Clin Latinoamer* 2010; 44 (4): 627-42.
124. Jensen N, Gartz J, Laatsch H. Aeruginascin, a trimethylammonium analogue of psilocybin from the hallucinogenic mushroom *Inocybe aeruginascens*. *Planta Med* 2006; 72 (7): 665-6.
125. Pomilio AB, Vitale AA. *Determinación cuali/cuantitativa de drogas de abuso en fluidos biológicos*. Eae-publishing, Editorial Académica Española (marca comercial de: OmniScriptum GmbH & Co. KG, Bahnhofstrasse 28, 66111 Saarbrücken, Alemania), 2017.
126. Antkowiak WZ. The chemistry and toxicology of mushroom alkaloids. En: Blum MS (ed), *Chemistry and Toxicology of Diverse Classes of Alkaloids*. Fort Collins, CO: Alaken, Inc, 1996.
127. Vollenweider FX, Leenders KL, Scharfetter C, Maguire P, Stadelmann O, Angst J. Positron emission tomography and fluorodeoxyglucose studies of metabolic hyperfrontality and psychopathology in the psilocybin model of psychosis. *Neuropsychopharmacology* 1997; 16 (5): 357-72.
128. Halberstadt AL, Geyer MA. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology* 2011; 61 (3): 364-81.
129. Halberstadt AL. Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens. *Behav Brain Res* 2015; 277: 99-120.
130. Watling R, Richardson MJ. Coprophilous fungi of the Falkland Islands. *Edinburgh J Bot* 2010; 67 (3): 399-423.
131. Coimbra VRM. Checklist of Central and South American Agaricales (Basidiomycota). II: Strophariaceae. *Mycosphere* 2015; 6 (4): 441-58.
132. Franco-Molano AE, Corrales A, Vasco-Palacios AM. Macrohongos de Colombia II. Listado de especies de los órdenes Agaricales, Boletales, Cantharellales y Russulales (Agaricomycetes, Basidiomycota). *Actual Biología* 2010; 32: 89-114.
133. Niveiro N, Popoff OF, Albertó EO. Contribución al conocimiento de los *Agaricales* s.l. de la Selva Paranaense argentina. *Bol Soc Argent Bot* 2010; 45 (1-2): 17-27.
134. Garcia Rollan M. *Setas venenosas, intoxicaciones y prevención*. Ed. Ministerio de Salud y Consumo, Secretaría General Técnica, Madrid, España, 1990; 213 pp
135. Tanaka M, Hashimoto K, Okuno T, Shirahama H. Neurotoxic oligoisoprenoids of the hallucinogenic mushroom, *Gymnopilus spectabilis*. *Phytochemistry* 1993; 34 (3): 661-4.
136. Räsch C. *The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and Its Applications*. Park Street Press, 2005; 944 pp.
137. Lee I-K, Cho S-M, Seok S-J, Yun B-S. Chemical constituents of *Gymnopilus spectabilis* and their antioxidant activity. *Mycobiology* 2008; 36 (1): 55-9.
138. Nozoe S, Koike Y, Tsuji E, Kusano G, Seto H. Isolation and structure of gymnoprenols, a novel type of polyisoprenepolyols from *Gymnopilus spectabilis*. *Tetrahedron Lett* 1983; 24: 1731-4.
139. Nozoe S, Koike Y, Kusano G, Seto H. Structure of gymnopilin, a bitter principle of an hallucinogenic mushroom, *Gymnopilus spectabilis*. *Tetrahedron Lett* 1983; 24: 1735-6.
140. Nozoe S, Koike Y, Ito N, Kusano G. Isolation and structure of gymnoprenol D, a homologous series of fully hydrated polyisoprenepolyol from *Gymnopilus spectabilis*. *Chem Lett* 1984; 6: 1001-2.
141. Findlay JA, He ZQ. Minor constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *J Nat Prod* 1991; 54 (1): 184-9.
142. Kusano G, Koike Y, Inoue H, Nozoe S. The constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *Chem Pharm Bull* 1986; 34: 3465-70.
143. Nuñez-Alarcon J, Paredes JCC, Carmona MT, Quinones M. Ostopanic acid, a cytotoxic fatty acid from *Gymnopilus spectabilis*. *Bol Soc Chil Quim* 2001; 46 (2): 227-9.
144. Kim KH, Choi SU, Lee KR. Gymnopilin K: a new cytotoxic gymnopilin from

- Gymnopilus spectabilis*. *J Antibiot* 2012; 65: 135-7.
145. Hatfield GM, Valdes LJ, Smith AH. The occurrence of psilocybin in *Gymnopilus* species. *Lloydia* 1978; 41: 140-4.
146. Nishio A, Kitamura N, Tanaka S, Miyazaki S, Ichianagi T, Shimomura N, et al. Multiple effects of gymnopilin on circulatory system of the rat. *Biol Pharm Bull* 2012; 35 (8): 1300-5.
147. Miyazaki S, Kitamura N, Nishio A, Tanaka S, Kayano T, Moriya T, et al. Gymnopilin-- a substance produced by the hallucinogenic mushroom, *Gymnopilus junonius*--mobilizes intracellular Ca(2+) in dorsal root ganglion cells. *Biomed Res* 2012; 33 (2): 111-8.
148. Kayano T, Kitamura N, Miyazaki S, Ichianagi T, Shimomura N, Shibuya I, et al. Gymnopilins, a product of a hallucinogenic mushroom, inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 2014; 81: 23-31.
149. Valenzuela E, Ramirez C, Moreno G, Polette M, Garnica S, Peredo H, et al. Agaricales más comunes recolectados en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile. *Bosque* 1996; 17 (1): 51-63.
150. Matsuura M, Saikawa Y, Inui K, Nakae K, Igarashi M, Hashimoto K, et al. Identification of the toxic trigger in mushroom poisoning. *Nat Chem Biol* 2009; 5 (7): 465-7.
151. Matsuura M, Kato S, Saikawa Y, Nakata M, Hashimoto K. Identification of cyclopropylacetyl-(R)-carnitine, a unique chemical marker of the fatally toxic mushroom *Russula subnigricans*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2016; 64 (6): 602-8.
152. Cho JT, Han JH. A case of mushroom poisoning with *Russula subnigricans*: development of rhabdomyolysis, acute kidney injury, cardiogenic shock, and death. *J Korean Med Sci* 2016; 31 (7): 1164-7.
153. Serés Garcia L. Intoxicación por *Russula subnigricans*. Barcelona, 2016. Accesible en: [http://www.micocat.org/UNCINULA09/micologia09/Toxicologia/Revision\\_Russula\\_subnigricans.pdf](http://www.micocat.org/UNCINULA09/micologia09/Toxicologia/Revision_Russula_subnigricans.pdf). Fecha de acceso: 24 de septiembre de 2018.
154. Kuo M. *The genus Russula*. 2009. Accesible en: <https://www.mushroomexpert.com/russula.html>. Fecha de acceso: 16 de agosto de 2018.
155. Chen Z, Zhang P, Zhang Z. Investigation and analysis of 102 mushroom poisoning cases in Southern China from 1994 to 2012. *Fungal Diversity* 2014; 64: 123-31.
156. Lee PT, Wu ML, Tsai WJ, Ger J, Deng JF, Chung HM. Rhabdomyolysis: an unusual feature with mushroom poisoning. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 (4): E17.
157. Saviuc P, Danel V. New syndromes in mushroom poisoning. *Toxicol Rev* 2006; 25 (3): 199-209.
158. Nishiyama K, Ohta Y, Matsuda N, Fujimoto R, Koike K. Back pain after wild mushroom consumption. *Emerg Med J* 2010; 27: 61.
159. Lin S, Mu M, Yang F, Yang C. *Russula subnigricans* poisoning: from gastrointestinal symptoms to rhabdomyolysis. *Wilderness Environ Med* 2015; 26 (3): 380-3.
160. Takahashi A, Agatsuma T, Matsuda M, Ohta T, Nunozawa T, Endo T, et al. Russuphelin A, a new cytotoxic substance from the mushroom *Russula subnigricans* Hongo. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992; 40 (12): 3185-8.
161. Stijve T, de Meijer AAR. Hydrocyanic acid in mushrooms, with special reference to wild-growing and cultivated edible species. *Dtsch Lebensm-Rundsch* 1999; 95 (9): 366-73.
162. Caspar J, Spittler P. A free cyanohydrin as arms and armour of *Marasmius oreades*. *ChemBiochem*. 2015;16 (4): 570-3.
163. Zagrobelny M, de Castro ÉCP, Møller BL, Bak S. Cyanogenesis in arthropods: from chemical warfare to nuptial gifts. *Insects* 2018; 9 (2): 51.
164. Blenis PV, Chow PS, Duncan I, Knowles NR. Cyanide levels near fairy rings affect the growth of grasses and fungi. *Can J Bot* 2004; 82 (9): 1324-9.
165. Gramss G, Voigt K-D, Bergmann H. Factors influencing water solubility and plant availability of mineral compounds in the tripartite fairy rings of *Marasmius oreades* (Bolt.: Fr.) Fr. *J Basic Microbiol* 2005; 45 (1): 41-54.
166. Serés Garcia L. Intoxicación por *Podostroma cornu-damae*. Barcelona, 2016. Accesible en:



- [http://www.micocat.org/UNCINULA09/micologia09/Toxicologia/Revision\\_Podostroma\\_cornu-damae.pdf](http://www.micocat.org/UNCINULA09/micologia09/Toxicologia/Revision_Podostroma_cornu-damae.pdf). Fecha de acceso: 3 de septiembre de 2018.
167. *Encyclopaedia britannica*. Accesible en: <https://www.britannica.com/list/7-of-the-worlds-most-poisonous-mushrooms>. Fecha de acceso: 3 de septiembre de 2018.
168. Ahn JY, Seok SJ, Song JE, Choi JH, Han SH, Choi JY, et al. Two cases of mushroom poisoning by *Podostroma cornu-damae*. *Yonsei Med J* 2013; 54 (1): 265-8.
169. Saikawa Y, Okamoto H, Inui T, Makabe M, Okuno T, Suda T, et al. Toxic principles of a poisonous mushroom *Podostroma cornu-damae*. *Tetrahedron* 2001; 57 (39): 8277-81.
170. Koichi M, Haruo T, Toshihiro Y, Masami O, Sadao N, Koichiro K. [Case report: food poisoning to death by *Podostroma cornu-damae*, its case history and autopsy findings]. Artículo en idioma japonés. *Acta Criminol Med Leg Jpn* 2003; 69 (1): 14-20.
171. Suzuki M, Katoh Y, Kumagai H, Saitoh M, Ishikawa H, Itoh H, et al. [Successful treatment in a case of *Podostroma cornu-damae* poisoning, a deadly poisonous mushroom]. Artículo en idioma japonés. *Chudoku Kenkyu* 2002; 15 (2): 177-82.
172. Yokoyama K, Gonmori K. [Increase of poisoning by tropical mushrooms in Japan in recent years]. Artículo en idioma japonés. *Chudoku Kenkyu* 2009; 22: 240-8.
173. Jang J, Kim CH, Yoo JJ, Kim MK, Lee JE, Lim AL, et al. An elderly man with fatal respiratory failure after eating a poisonous mushroom *Podostroma cornu-damae*. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2013; 75 (6): 264-8.
174. Masri HJ, Maftoun P, Malek RA, Boumehira AZ, Pareek A, Hanapi SZ, et al. The edible mushroom *Pleurotus* spp.: II. Medicinal values. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 2017; 6 (1): 1-11.
175. Paul C, Roy T, Das N. Potentiality of oyster mushroom (*Pleurotus* Spp.) in medicine- a review. *Ann Food Process Preserv* 2017; 2 (2): 1014.
176. Al-Deen IHS, Twaij HAA, Al-Badr AA, Istarabadi TAW. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* in mice. *J Ethnopharmacol* 1987; 21: 297-305.
177. Juntos P, Rebolj K, **Sepčić K**, Maček P, Žužek MC, Cestnik V, et al. Ostreolysin induces sustained contraction of porcine coronary arteries and endothelial dysfunction in middle- and large-size vessels. *Toxicon* 2009; 54 (6): 784-92.
178. Frangež R, Šuput D, Molgó J, Benoit E. Ostreolysin a/pleurotolysin b and equinatoxins: structure, function and pathophysiological effects of these pore-forming proteins. *Toxins (Basel)* 2017; 9 (4): 128.
179. Žužek MC, Maček P, **Sepčić K**, Cestnik V, Frangež R. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon* 2006; 48 (3): 264-71.
180. Deepalakshmi K, Mirunalini S. Toxicological assessment of *Pleurotus ostreatus* in Sprague Dawley rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Diseases* 2014; 4 (3): 139-45.
181. Tomita T, Noguchi K, Mimuro H, Ukaji F, Ito K, Sugawara-Tomita N, et al. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *J Biol Chem* 2004; 279 (26): 26975-82.
182. Li YR, Liu QH, Wang HX, Ng TB. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780 (1): 51-7.
183. Ngai PH, Ng TB. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72 (6): 1185-91.
184. Shibata T, Kudou M, Hoshi Y, Kudo A, Nanashima N, Miyairi K. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin erylysin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon* 2010; 56 (8): 1436-42.
185. Chou P-Y, Hong C-H, Chen W, Li Y-J, Chen Y-S, Chiou Y-Y. Glass distilling collector applied for HCN recovery from submerged culture broth and fruiting body of *Pleurotus eryngii* for identification and quantification. *J Agric Food Chem* 2006; 54 (5): 1551-6.
186. Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K. Analysis of indole compounds in edible *Basidiomycota* species after thermal processing. *Food Chem* 2012; 132 (1): 455-9.

187. Stone TW, Mackay GM, Forrest CM, Clark CJ, Darlington LG. Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (7): 852-9.
188. Ulziijargal E, Yang J-H, Lin L-Y, Chen C-P, Mau J-L. Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food Chem* 2013; 138 (1): 70-6.
189. Floyd JS, Heckbert SR, Weiss NS, Carrell DS, Psaty BM. Use of administrative data to estimate the incidence of statin-related rhabdomyolysis. *J Amer Med Assoc* 2012; 307 (15): 1580-2.
190. Wang S-J, Li Y-X, Bao L, Han J-J, Yang X-L, Li H-R, et al. Eryngiolide A, a cytotoxic macrocyclic diterpenoid with an unusual cyclododecane core skeleton produced by the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Org Lett* 2012; 14 (14): 3672-5.
191. Lee I-S, Ryoo I-J, Kwon K-Y, Ahn JS, Yoo I-D. Pleurone, a novel human neutrophil elastase inhibitor from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*. *J Antibiotics* 2011; 64 (8): 587-9.
192. Kikuchi T, Motoyashiki N, Yamada T, Shibatani K, Ninomiya K, Morikawa T, et al. ergostane-type sterols from king trumpet mushroom (*Pleurotus eryngii*) and their inhibitory effects on aromatase. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (11): 2479.
193. Stadler M, Mayer A, Anke H, Sterner O. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of basidiomycetes. *Planta Med* 1994; 60 (2): 128-32.
194. Li G, Wang X, Zheng L, Li L, Huang R, Zhang K. Nematocidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. *Ann Microbiol* 2007; 57: 527-9.
195. Lechner BE, Petersen R, Rajchenberg M, Albertó E. Presence of *Pleurotus ostreatus* in Patagonia, Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 111-4.
196. Lechner BE, Wright JE, Albertó E. The genus *Pleurotus* in Argentina: mating tests. *Sydowia* 2005; 57 (2): 233-45.
197. Lechner BE, Wright JE, Albertó E. The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia* 2004; 96 (4): 845-58.
198. Hongo T, Izawa M. Kinoko (*Fung*) En idioma japonés. 2006; 1-383.
199. Naka T, Jones D, Baldwin I, Fealy N, Bates S, Goehl H, et al. Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report. *Crit Care* 2005; 9: R90-5.
200. Wiegele M, Krenn CG. Cytosorb™ in a patient with *Legionella* pneumonia-associated rhabdomyolysis: a case report. *ASAIO J* 2015; 61 (3): e14-6.
201. Laddomada T, Doronzio A, Balicco B. A novel approach to the treatment of acute renal failure associated with rhabdomyolysis. *Intensive Care Med Exp* 2015; 3 (Suppl 1): A61.
202. Romano GM, Iannone L, Novas MV, Carmarán C, Romero AI, Lopez SE, Lechner BE. Hongos tóxicos en la ciudad de Buenos Aires y alrededores. *Medicina (Buenos Aires)* 2013; 73: 406-10.

+++++\*\*\*\*\*+++++

# POLUTANTES AMBIENTALES NO CONVENCIONALES. PAPEL DE LAS PROTEASAS DE LA CUCARACHA PERIPLANETA AMERICANA Y DEL REDUVÍDEO TRIATOMA INFESTANS.

Ángel Alonso<sup>1</sup>

## Resumen

Se exponen los datos sobre la antigenicidad de las proteasas de la cucaracha *Periplaneta americana* y de la vinchuca *Triatoma infestans* en seres humanos residentes en la CABA y Gran Buenos Aires, así como en las provincias del norte y noreste del país. La antigenicidad cruzada entre ambas las convierte en 2 insectos de gran importancia en el ecosistema, y sus restos momificados de estadios adultos y ninfales de trascendencia para diversas patologías infecciosas y respiratorias.

## Abstract

Data concerning the cross-reactivity between the serin-proteases of the cockroach *Periplaneta americana* and the reduviid *Triatomainfestans* are exposed. Humans living in Buenos Aires as well as those living in the north of the country inhale mummified particles containing the powerful antigens of both insects and develop chronic respiratory illnesses.

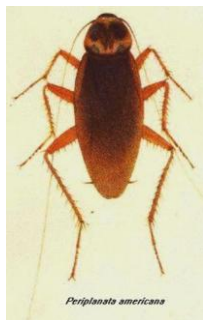
## Introducción y antecedentes de investigación

La *Periplaneta americana* (Pa) o cucaracha americana o *Blattaria americana* o sudamericana o cucaracha roja es en realidad originaria del África tropical donde fue identificada científicamente. La taxonomía (Linnaeus, 1758) revela que pertenece al Reino Animalia, Filo Arthropoda, Clase Insecta, Subclase Pterygota, Infraclase Neoptera, Orden Blattodea, Familia Blattidae, Género *Periplaneta*, Especie Americana. Es una plaga urbana muy difícil de erradicar conjuntamente con *Blatta orientalis* y *Blattella germanica*. Presentan dimorfismo sexual siendo la hembra algo mayor que el macho (hasta 40 mm). Poseen alas que les permiten vuelos muy cortos a los machos por ser más estilizados en su cuerpo. Su anatomía se divide en cabeza, tórax y abdomen, y poseen antenas, ojos, fémur, tibia, tarsus, tegminas, alas y cercus. Viven en áreas húmedas con temperaturas medias de 25-29° C, ya que no soportan el frío. Como tienen ftofobia, prefieren lugares oscuros, como grietas, sótanos, alcantarillas, etc. Se alimentan de materias en descomposición y restos de comidas, aunque algunos autores señalan que pueden ingerir papeles o telas sucios o descartados. Las cucarachas son ovíparas excepto la *Diploptera punctata* que es vivípara. La ooteca se fija a una superficie por medio de pegamentos de las glándulas bucales, se forman cada 7 días, con 15-20 huevos cada una, y a los 50 días dan lugar a las ninfas que rompen la ooteca. Poseen una metamorfosis paurometabólica, o sea, que las inmaduras se parecen a las adultas aunque sin órganos sexuales. Son maduras luego de 10-15 mudas. Son transmisoras mecánicas de patógenos bacterianos, virales, micóticos y parasitarios, y por su contacto con los alimentos son un grave problema sanitario. Así, se demostró la presencia de especies de *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nocardia sp.*, *Mycobacterium leprae*, *Shigella sp.*, *Serratia marscesens* y *Clostridium perfringens*. Entre los parásitos más comunes se hallaron huevos o larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Entamoebas histolytica y coli*, *Giardia lamblia*, *Hymenolepis nana y diminuta*, *Necator americano*, *Trichuris trichura*, *Lophomonas blattarum*, *Leptomonas sp.*, *Leidynema appendiculatum*, *Hammerschmidtelladiesingi*, *Blastocytis hominis*, *Cryptosporidium sp.* e *Iodamoeba bütschilli*. Hongos como *Aspergillus fumigatus y niger* también contaminan sus heces y patas (38).

Por otro lado, Kern (1921) y Cooke (1922) llamaron la atención acerca del papel que jugaría la inhalación del polvillo habitacional (PH) en los pacientes con signo-sintomatología respiratoria (síndrome rinitis/asma). En 1940, Boatner y, en 1942, Sutherland purificaron

muestras del PH de los afectados, y sugirieron que los insectos tendrían un papel en la etiopatogénesis del síndrome. Pasaron 22 años para que en 1964, Voorhorst, ratificara que el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) era el responsable del cuadro (27). Sin embargo, en 1971, 1976, 1978 y 1979, Kang y Bernton responsabilizaron a los detritos de las cucarachas como otros responsables de la patología respiratoria, y comprobaron que los respondedores a los ácaros también lo eran a las cucarachas, enfatizando la trascendencia del hábitat de los enfermos (31-37). A partir de 1980, estudiamos las propiedades inmunoquímicas de un extracto de Pa, obtenido a partir de las estructuras quitinosas del insecto pues éstas al momificarse pasan a integrar el PH (40). Dado que el *Triatoma infestans* (Ti) es otro insecto que parasita casi todo el país, y es como una “cucaracha rural”, a partir de 1984, se aplicó similar estrategia de investigación para valorar su papel en enfermos respiratorios de varias provincias del norte y noreste argentino (9). El Ti fue obtenido por la generosa contribución de la Prof. Consulta Dra. Elvira D. de Isola, de la Primera Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina (UBA), quien donó insectos libres de infección parasitaria. Los triatomíneos son reduvídeos hematófagos de gran importancia sanitaria, que son conocidos como vinchucas, chipos, chirimachas, pitos, chinches aladas, barbeiros, *conesone bugs* y *kissing bugs*, según la zona de América del Sur, Central y del Norte, en que se los halle. Son un centenar de especies silvestres que se encuentran en nidos de aves, ooquedades de los árboles, madrigueras y cúmulos de piedras. Las más importantes son las que se habituaron a colonizar las viviendas humanas (Ti, *dimidiata*, *sórdida*, *rubrovaria*, *eratyrisiforme* y *spinolai*) (25). Poseen una cabeza con una trompa picadora, ojos compuestos, antenas finas y largas, tórax muy queratinizado y dos pares de alas; el abdomen permite su diagnóstico por sus manchas distintivas. Son lucífugas y nocturnas y pican, sin dolor, cuando la víctima está dormida. Ahí defecan y liberan parásitos que albergaban en su intestino, y que, por rascado la víctima introduce en su organismo, e inicia la transmisión de la enfermedad de Chagas-Mazza o tripanosomiasis americana. Hay especies fitófagas que no agreden a los mamíferos, pero que desde el punto de vista antigénico poseen similar importancia por la inhalación de sus desechos momificados y excretas, que son inhalados (e ingeridos) por las personas. Pasan por cinco estadios ninfales con un ciclo lento de varios meses dependiendo de la temperatura y humedad ambientales (Figs. 1 y 2).

El objetivo de este estudio fue valorar la antigenicidad en modelos animales y en seres humanos con el síndrome rinitis/asma de los antígenos provenientes de la Pa y del Ti, analizando la posible reactividad cruzada entre ambos dada la notable polución de estos dos insectos en la geografía argentina (1-a-7).



**Figura 1.** *Periplaneta americana*



**Figura 2.** *Triatoma infestans*

## Materiales y métodos

1. **Antígenos:** extractos del cuerpo entero de Pa y de Ti se prepararon según las pautas descriptas por Frugoni y Hansen. Con cada uno, por separado, se inmunizaron conejos durante 13 semanas, con 0,5 ml del extracto puro más 0,5 ml del adyuvante de Freund

completo; luego de 10 días de la última inoculación fueron sangrados a blanco y los sueros guardados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (18).2. **Fraccionamiento por columnas de Sephadex G-200** (de 22 mm x 780 mm) y **DEAE-celulosa** (de 25 mm x 380 mm): 5 ml de cada extracto se pasaron, separadamente, y se eluyeron con buffers de fosfato 0,15 M ClNa, pH 8 a 4  $^{\circ}\text{C}$ , para Sephadex, y de 0,01 M a 0,5 M, pH 8 a pH 6, para DEAE-celulosa. Las proteínas y los azúcares se midieron en un espectrofotómetro Metrolab a 280 nm y 470 nm de densidad óptica, respectivamente.

3. **Cuantificación de proteínas, de hexosas y de pesos moleculares:** el método de Bradford (12) midió las proteínas y el del indol los azúcares; se compararon con marcadores estandarizados conocidos y se detectaron por escala semilogarítmica los pesos moleculares de la Pa y del Ti.

4. **Técnicas inmunológicas:** se aplicaron a los sueros de conejos inoculados con Pa y Ti, el Ouchterlony, la hemaglutinación pasiva de Boyden y la inmunolectroforesis (11-15-23).

5. **Pacientes: Grupo A:** 50 atópicos, 29 mujeres y 21 varones con edades entre los 19 y 54 años, con rinitis perenne/asma bronquial, empeoramiento con el PH y prueba cutánea positiva de  $\geq 10$  mm con el Dpt, residentes de la CABA y Gran Buenos Aires; **Grupo B:** 50 atópicos, 27 mujeres y 23 varones con edades entre los 22 y 48 años, residentes desde, por los menos, 10 años en las provincias de Santiago del Estero, Chaco, Corrientes y Misiones, con similar cuadro respiratorio; **Grupo C:** 25 personas, 18 mujeres y 7 varones sin enfermedad respiratoria ni antecedentes heredofamiliares de atopía, con edades entre los 18 y 33 años, residentes en la misma zona geográfica y el **Grupo D:** 25 personas, 10 mujeres y 15 varones, de la CABA, sin enfermedad respiratoria ni antecedentes heredofamiliares de atopía, con edades entre 25 y 55 años, que colaboraron como controles, y que también cumplieron el consentimiento informado como los experimentales.

6. **Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata:** se emplearon como antígenos, el PH, el Dpt, la Pa, el Ti y los picos proteicos de Pa (76 y 100) y de Ti (20 y 50) de Sephadex G-200, en la dilución 1/100. Se valoró el eritema-pápula a los 20 min en comparación con los habones de histamina (control positivo) y de solución fisiológica pH 7,2 (control negativo). Fue positiva toda prueba  $\geq 5$  mm. Los pacientes no habían ingerido ningún fármaco que interfiriera la reacción cutánea (1,-39).

7. **Radioinmunoensayos:** el PRIST valoró la IgE sérica total siendo normal hasta 120 KU/L; el RAST fue fabricado con los extractos de Pa y Ti (13 mg/ml de c/u), unidos covalentemente a discos de celulosa (SS547) bajo bromuro de cianógeno a pH 11 por 2 hs en medio alcalino. Se midió en PRU/ml, siendo significativos los valores superiores a 0,35 PRU/ml. El RAST-inhibición valoró la especificidad al emplear antígenos no relacionados (8,-13,-19).

8. **SDS-PAGE y Western-blots:** 20  $\mu\text{l}$  de Pa y de Ti se sembraron en geles de poli(acrilamida) al 15% (Laemmli), y luego de corridos, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, para ser incubadas con anti-Pa y anti-Ti durante la noche; luego se incubaron con anti-IgG y anti-IgE conjugados con peroxidasa, para la detección colorimétrica (22,-24,-26).

9. **Ensayos de actividad enzimática:** minigeles de 10 x 10 cm c/u de poli(acrilamida) al 12% con gelatina al 0,2%, sembrados con Pa y Ti, se corrieron 2 hs a 130 V. Lavados con tritón-X-100 0,15%, incubados con MES pH 6 en Tris-AcH 100 mM a pH 3,5 y pH 8,5, se colorearon con azul de Coomassie R-250, y decoloraron con metanol-acético. Para inhibir las proteasas se usaron reactivos específicos para cada una de ellas (10-17-20).10.

**Electroforesis capilar:** se desarrolló en Bio-Rad (Hércules, California, USA) con extractos de Pa y Ti en un Bio-Focus 3000, de acuerdo a las pautas del laboratorio en tiempo y potencia eléctrica. Se valoraron los trazados y la superposición de imágenes.

11. **Vacunoterapia (inmunoterapia) con antígenos de Pa:** los pacientes atópicos recibieron durante 3 años inyecciones semanales por vía subcutánea del extracto de Pa desde 1 mg/mL hasta 13 mg/mL valorándose los niveles séricos de las IgE e IgG-anti-Pa, así como, de las IL-2, IL-4 e IL-4R, cuyos datos se exponen en las Tablas 1 a 5.

**TABLA 1**

- Valores de la IgE sérica total y específica antes y después de la inmunoterapia.

	IgE basal KU/L	IgE-RAST-basal anti-Pa. (PRU/mL)	IgE-RAST-anti-Pa. después de 3 años. (PRU/mL).
Pacn°			
1 :	130	1,40	0,20
2 :	162	0,45	0,10
3 :	184	0,65	0,30
4 :	220	0,60	0,40
5 :	145	1,70	0,35
6 :	370	1,10	0,10
7 :	135	1,00	0,60
Grupo Control que no realizó vacunoterapia :			
8 :	600	0,90	0,90
9 :	120	1,20	1,50
10 :	330	0,80	1,20
11 :	410	0,70	0,70
12 :	280	1,50	1,30
Valor promedio de la IgE sérica total basal de la población estudiada :			
	230,50 KU/L con un DE $\pm$ 115,39 KU/L.		
IgE específica : grupo vacunado : antes : x : 0,985 PRU/mL con un DE $\pm$ 0,455 PRU/mL ; después de 3 años : x : 0,29 PRU/mL con un DE $\pm$ 0,165 PRU/mL.			p $\leq$ 0,02.
IgE específica : grupo no vacunado : antes : x : 1,02 PRU/mL con un DE $\pm$ 0,327 PRU/mL ; después de 3 años : x : 1,12 PRU/mL con un DE $\pm$ 0,318 PRU/mL.			p = 0,50

**TABLA 2**

- Valores de la IgG sérica específica antes y después de la inmunoterapia.

	IgG-RAST-basal Anti-Pa.	IgG-RAST-anti-Pa. después de 3 años
1 :	50	150
2 :	44	280
3 :	32	350
4 :	68	190
5 :	12	170
6 :	24	140
7 :	28	235
Grupo control que no realizó vacunoterapia :		
8 :	33	40
9 :	100	140
10 :	20	30
11 :	40	50
12 :	50	70
IgG-RAST-grupo vacunado : basal : x : 36,85 UI/ml con un DE $\pm$ 18,61 UI/ml ;		
A los 3 años : x : 216,42 UI/ml con un DE $\pm$ 76,34 UI/ml ; p $\leq$ 0,001.		
IgG-RAST-grupo no vacunado : basal : x : 48,6 UI/ml con un DE $\pm$ 30,73 UI/ml ;		
A los 3 años : x : 66 UI/ml con un DE $\pm$ 43,93 UI/ml ; p = 0,50.		

**TABLA 3**

- Valores de la IL-2 sérica antes y después de la inmunoterapia.

Pac. n°	Basal (UI/mL)	Después de 3 años. (UI/mL).
1 :	173	84
2 :	210	120
3 :	150	110
4 :	125	100
5 :	90	50
6 :	310	125
7 :	280	130
Grupo vacunado : x basal : 191,14 UI/mL con un DE $\pm$ 80,62 UI/mL.		
Después de 3 años : x : 102,71 UI/mL con un DE $\pm$ 28,50 UI/mL.		
p $\leq$ 0,02.		
Grupo Control que no realizó vacunoterapia:		
8 :	300	315
9 :	220	200
10 :	130	150
11 :	110	140
12 :	140	120
x basal : 180 UI/mL con un DE $\pm$ 79,05 UI/mL ;		
Después de 3 años : x : 185 UI/mL con un DE $\pm$ 78,42 UI/mL.		
p = 0,50.		



**TABLA 4**

- Valores de la IL-4 sérica antes y después de la inmunoterapia.
- Pac. n°:      basal (UI/mL)                      después de 3 años (UI/mL)
- 1 :            310    220
- 2 :            460    310
- 3 :            270    180
- 4 :            280    220
- 5 :            300    150
- 6 :            420    190
- 7 :            250    110
- Grupo Control que no realizó vacunoterapia :
- 8 :            270    250
- 9 :            430    400
- 10 :          340    310
- 11 :          450    430
- 12 :          380    380
- Grupo vacunado durante 3 años : x basal : 327,14 UI/mL con un DE  $\pm$  74 UI/mL;
- x después de 3 años : 177,14 UI/mL con un DE  $\pm$  66,81 UI/mL y  $p \leq 0,01$ .-
- Grupo control no vacunado : x basal : 374 UI/mL con un DE  $\pm$  72,31 UI/mL ;
- x después de 3 años : 370 UI/mL con un DE  $\pm$  75,16 UI/mL y  $p = 0,50$ .-

**TABLA 5**

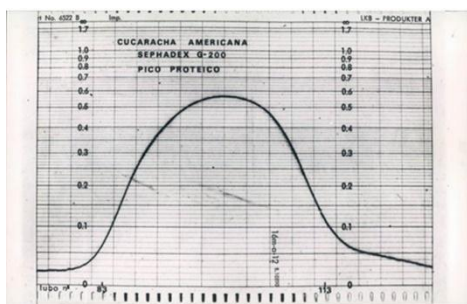
- Valores del IL-4R sérico antes y después de 3 años de inmunoterapia.
- Pac. n° :      Basal (c.p.m.)                      después de 3 años (c.p.m.)
- 1 :            2100    1300
- 2 :            2400    1700
- 3 :            2500    1200
- 4 :            3000    2200
- 5 :            2000    920
- 6 :            2800    1500
- 7 :            2400    1100
- Grupo control que no recibió vacunoterapia :
- 8 :            2000    1800
- 9 :            2400    2200
- 10 :          2700    2600
- 11 :          2200    2200
- 12 :          2500    2500
- Grupo vacunado por 3 años : x basal : 2482,85 c.p.m. con un DE  $\pm$  362,60 c.p.m.;
- x después de 3 años de vacunación : 1442,85 c.p.m. con un DE  $\pm$  369,81 y  $p \leq 0,001$ .-
- Grupo control no vacunado : x basal : 2360 c.p.m. con un DE  $\pm$  270,18 c.p.m. ;
- x después de 3 años : 2260 c.p.m. con un DE  $\pm$  313,04 y  $p = 0,50$ .-

## Resultados

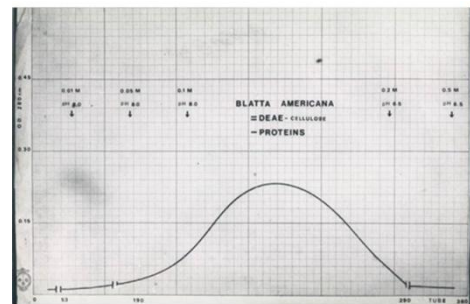
Las columnas de Pa mostraron *proteínas* por Sephadex G-200 entre los tubos 76-a 115 y por DEAE entre 190-y 290; las *hexosas* ocuparon los tubos 12,64 y 102, en la primera, y los tubos 70,100 y 150 en la segunda. El Ti las reveló por Sephadex entre los tubos 18-y 22 y por DEAE entre 45-y 55; las hexosas aparecieron en los tubos 15,-25 y 36, en la primera, y los tubos 42-y 48 en la segunda. El Bradford detectó 42 mg/ml de proteínas en Pa y 13 mg/ml para Ti mientras las hexosas eran de 2000 mcg/ml para Pa y de 920 mcg/ml para Ti. Estos datos abogan por la composición glucoproteica de Pa y de Ti, que como inmunógenos produjeron anticuerpos específicos en conejos revelados por el Ouchterlony, Boyden e inmunolectroforesis, con bandas de precipitación e identidad de Pa con *Blatta* germánica, y títulos de 1/1024 en el Boyden; el Ti detectó anticuerpos específicos 1/4096 en el Boyden y bandas de precipitación contra Pa en una reacción cruzada, lo que sugirió epitopes comunes entre los extractos. Las absorciones de los sueros de conejo anti-Pa y anti-Ti, realizadas con Pa y Ti, en forma directa y cruzada, fueron positivas, siendo más notorias las de la Pa que las del Ti, posiblemente, por mayor riqueza proteica y antigénica, y por razones fisicoquímicas de interferencia inespecífica. El peso molecular de Pa fue de 180 kDa y el del Ti de 92 kDa, aproximadamente. Los pacientes testificados del **Grupo A** (IgE total 225 $\pm$ 45



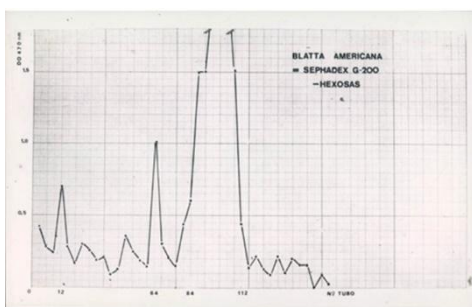
KU/L) revelaron positividad al PH, Dpt y Pa y sus picos proteicos y no al Ti; los del **Grupo B** (IgE total  $267\pm 52$  KU/L) mostraron positividad al PH, Dpt, 28 al Ti y sus picos proteicos y 10 a Pa y sus picos proteicos; el **Grupo C** (IgE total  $55\pm 12$  KU/L) exhibió positividad al Ti en un caso, y negatividad al resto y el **Grupo D** (IgE total  $33\pm 15$  KU/L) no evidenció reactividad a ningún antígeno. En los sueros positivos las IgE-RAST-anti-Pa y anti-Ti fueron superiores a 0,35 PRU/ml. El RAST-inhibición ratificó la especificidad de las reacciones al presentar negatividad con epitelio de gato y pólenes de Ambrosia y Lolium perenne como antígenos alternativos. La vacunoterapia con Pa mostró el descenso de la IgE-anti-Pa y el ascenso de la IgG-anti-Pa al cabo de los 3 años de inoculación, al igual que, los cambios favorables de las citoquinas estudiadas que expresaron una menor actividad inflamatoria en los pacientes respiratorios. El SDS-PAGE reveló 13 bandas proteicas que al ser marcadas con I<sup>125</sup> detectó unión a 3 de ellas coincidentes con los tubos 18,-21, 22 y 45,-55, con patrones a pI de 4,5-5,0. La gelatinólisis fue notable a 56 kDa y la proteólisis a pHs 4,5; 6,5 y 8,5, fue de mayor actividad con éste último, que sugeriría una serin-proteasa. Una banda de 28 kDa y otra de 45 kDa reveló reactividad cruzada entre Pa y Ti. La electroforesis capilar mostró gráficas similares para la Pa, el Ti y sus ninfas, que al superponerse eran coincidentes, lo que ratifica la existencia de epitopes comunes, no necesariamente iguales, expresados tempranamente en el Ti (Figs. 3 a 15). La Dra. S.G. Irañeta, de nuestro equipo de investigación, en cultivos bacterianos del exoesqueleto de las Pa, identificó diversos gérmenes (cocos y bacilos) Gram positivos y negativos, y en agar Saboureaud, detectó el crecimiento de hongos (*Aspergillus flavus*), cuyo análisis más pormenorizado está llevando a cabo, con lo cual se ratifica su condición de transmisora mecánica de patógenos humanos.



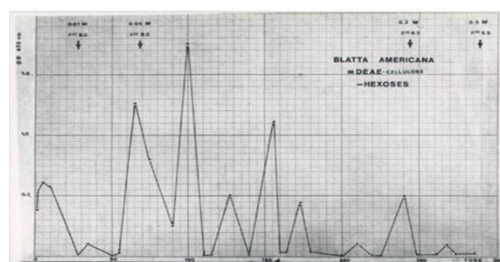
**Figura 3.** Pico proteico de Pa por Sephadex G-200



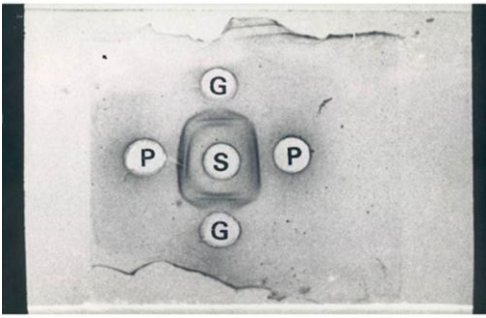
**Figura 4.** Pico proteico de Pa por DEAE-celulosa



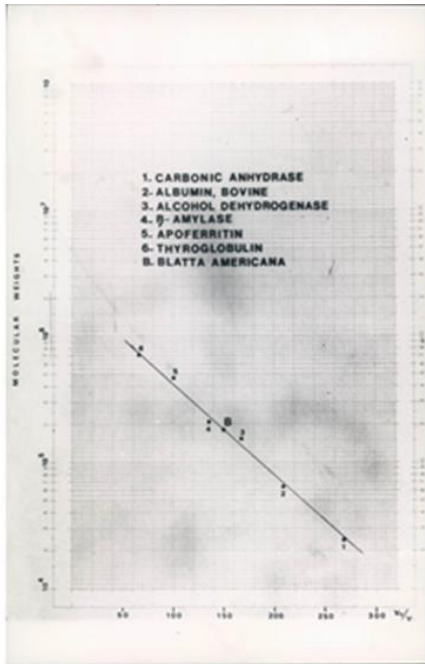
**Figura 5.** Pico hexosas por DEAE-celulosa



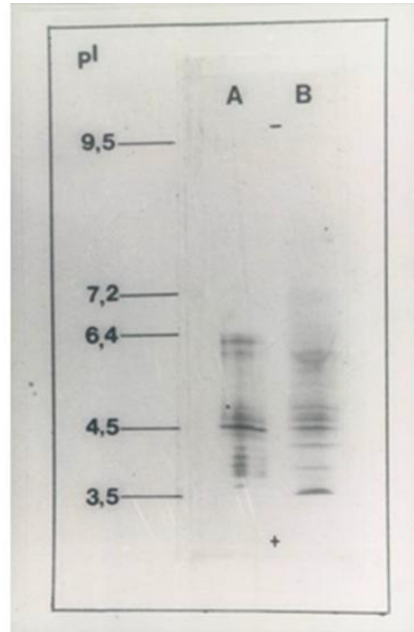
**Figura 6.** Picos de hexosas por DEAE-celulosa



**Figura 7.** Ouchterlony: P es Pa; G es *Blatta germanica*; S: suero anti-Pa. Hay identidades entre ambos extractos.

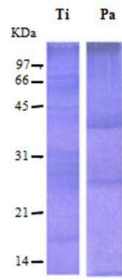


**Figura 8.** Pesos moleculares de marcadores y de Pa



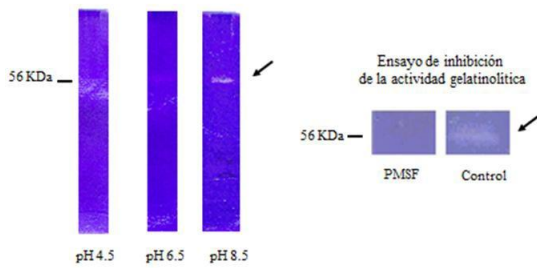
**Figura 9.** Isoelectroenfoque entre Ti(A) y Pa (B). Bandas comunes a igual pI

**Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana* (Pa)**

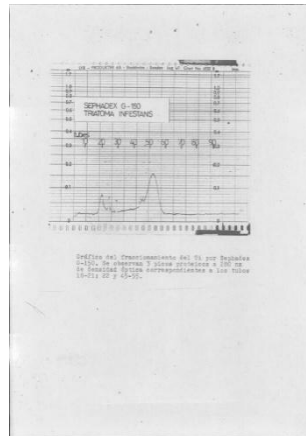


**Figura 10.** Bandas similares a iguales kDa: Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana*(Pa)

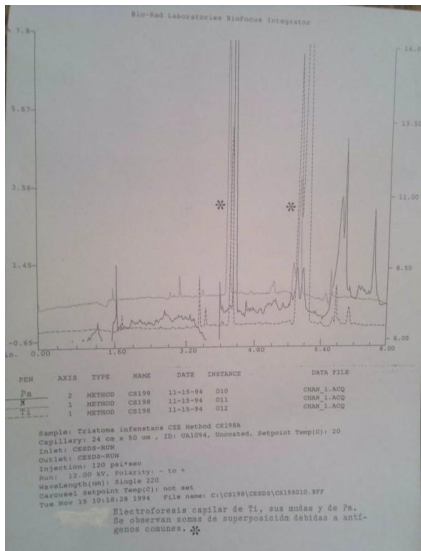
**Caracterización de la actividad gelatinolítica del extracto de Ti**



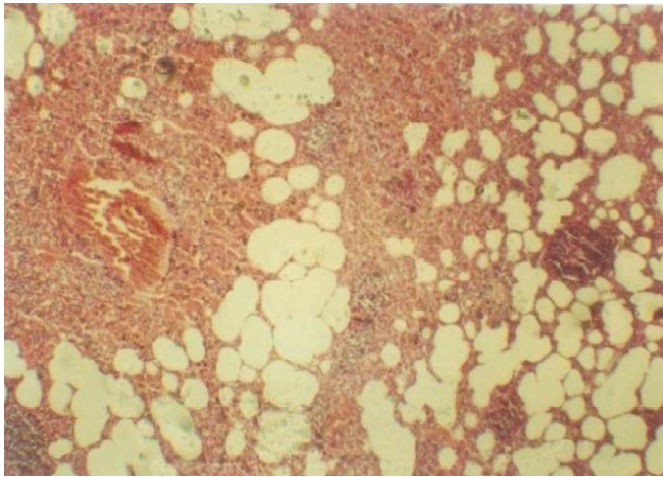
**Figura 11.** Gelatinolisis de la serin-proteasa Del Ti inhibida por el PMSF. Caracterización de la Actividad gelatinolítica del extracto de Ti



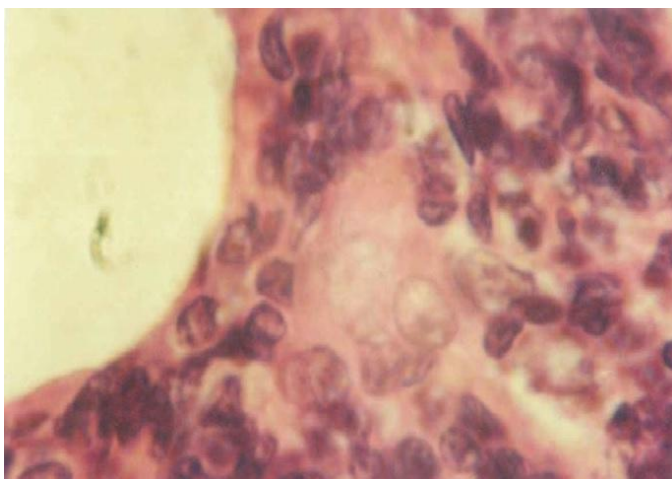
**Figura 12.** Picos proteicos del Ti por Sephadex G-150



**Figura 13. Electroforesis capilar de Pa, Ti y sus estadios Ninfales**



**Figura 14. Pulmón de cobayo aerosolizado con Pa**



**Figura 15. Pulmón de cobayo aerosolizado con Ti.**

## Discusión

Se exponen los datos obtenidos merced al empleo de técnicas inmunoquímicas e *in vivo* acerca de la composición biomolecular de los extractos de la Pa y del Ti, originales para nuestro país, y para buena parte de América Latina, por la trascendencia de que ambos insectos comparten epitopes inmunológicamente activos, y, que en este caso, podríamos bautizar como Ti-1 (92 kDa), hasta que más datos fisicoquímicos y su clonación establezcan la nomenclatura respectiva. Merecen destacarse los trabajos de Brenner de la UNLP, que destacó la importancia de las lipoproteínas hemolinfáticas de los insectos (Ti, Pa, la polilla gigante (*Hyalophora cecropia*), la cigarra (*Melarrophis differentialis*) y la langosta (*Locusta migratoria*), caracterizando HDLp o lipophorin, las VHDL, las VLDL y los NEFA, entre los 78 y 225 kDa. El antígeno utilizado por nosotros podría estar integrado en las lipoproteínas señaladas, no obstante, haber sido nuestro antígeno sometido a un previo proceso de deslipidización, que no debería modificar la estructura proteica que la compone. Además estas proteínas forman un hexámero o hexamerinas (6 subunidades de 70-85 kDa cada una), con gran riqueza de tirosina, fenilalanina y metionina, que podrían justificar las propiedades enzimáticas detectadas en los experimentos. Los insectos emplean sus lípidos como combustible para el comienzo de sus vuelos (41). En América, las cucarachas poseen unas 70 especies y en el mundo unas 2000. El Bla g 1 tiene 7 tándems de 100 aminoácidos cada uno; Bla g 2 (36 kDa) es una aspártico- proteasa del tipo pepsina, catepsina y quimosina; Bla g 4 es una lipocalina; Bla g 5 (23 kDa) es una glutatión-S-transferasa y Bla g 6 (21 kDa) es homóloga de la troponina-C. Por su parte, Pa expresa Per a 1 (25 kDa) con 3 isoformas (1.0101; 1.0103 y 1.0104), Per a 3 (72 kDa) y Per a 7 (33 kDa), cercanos estos últimos a la sumatoria del valor hallado en este estudio. Su importancia epidemiológica no se discute habida cuenta de la relación con enfermedades infecciosas de gran repercusión. Nuestro aporte profundiza ese aspecto al vincular cuadros respiratorios crónicos con la inhalación de proteínas provenientes de los detritos y momificaciones de los insectos adultos y de sus estadios ninfales. Un modelo experimental desarrollado en cobayos con la inhalación crónica de las proteínas de la Pa y del Ti, por separado, y que no se adjuntó a este trabajo por su extensión, demostró la producción de una neumonitis típica con bronquiolitis, infiltrados inflamatorios y granulomas no caseosos, que por su cronicidad podrían ser capaces de inducir una fibrosis pulmonar, considerando que son enzimas proteolíticamente activas (serin-proteasas) (28,-29,-30). Queda así demostrada la capacidad sensibilizante de ambos insectos, y la reactividad cruzada inmunológica, con lo cual la situación clínica de los asmáticos se complica al cambiar de residencia en el país o en zonas muy expuestas de América Latina. Si la temperatura ambiente se incrementa en 1 o 2 grados en el futuro, la pululación de estos insectos será mayor, y la polución que de ellos dependa también empeorando la patología respiratoria (y la infectológica), por lo cual, se debería disponer de mayores estrategias para combatirlos. (“Teoría medio-ambiental de las enfermedades alérgicas”).

## Bibliografía

1. Alonso A., Scavini L.M., Albónico J.F., Mouchián K.: “Immunochemical properties of the antigens of *Blatta americana*”. *Allergol et Immunopathol.*, 1987; 15: 109-115.
2. Alonso A., Albónico J.F., Belloti M., Mouchián K., Pionetti C.H. “Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by the antigens of *Periplaneta americana*”. *Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1992; 2:263-269.
3. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Belloti M., Pionetti C.H. “Producción de anticuerpos IgE-anti-*Periplaneta americana* en cobayos por vía inhalatoria”. *Prensa Med. Argent.* 1993; 80:100-105.

4. Alonso A., Albónico J.F., Isola E.D., Scavini L.M., Mouchián K.: "Cross-reactivity between antigens of *Blatta americana* and *Triatoma infestans*". XIII° International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Montreaux (Suiza), 1998.
5. Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M. "Immunochemical properties of the antigens of *Triatoma infestans* J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1992; 2: 154-159.
6. Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M. "Anticuerpos IgE-anti-*Triatoma infestans* en humanos atópicos y no-atópicos". Prensa Méd. Argent. 1994; 81: 300-307.
7. Alonso A., Caccuri R., Scavini L., Rodríguez S., Marino G. "Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by *Triatoma infestans* antigens" J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1994; 4: 19,-25.
8. Anderson M.C., "Methodology for RAST-inhibition" In: Methods of the allergenic products. FDA. Bethesda 1986; 1,-17.
9. Atías A., Neghme A. "Parasitología clínica". Edit. Mediterráneo. Santiago de Chile. 1993, p. 57,-89.
10. Barret A.J. "Classification of peptidases". Meth.Enzymol.1994;244:1,-5.
11. Boyden S.V. "The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera". J. Exp. Med., 1951; 93:107,-114.
12. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal.Biochem., 1976; 72:248,-255.
13. Ceska M., Erikson R., Varga J.M. "Radioimmunosorbent assay of allergens. J. Allergy Clin. Immunol.1986; 78: 436,-445.
14. Chapman M.D., Marshal N.A., Saxon A. "Identification and partial purification of species specific allergens from *Triatoma protracta*", J. Allergy Clin. Immunol. 1986; 78: 436,-439.
15. Crowle A. (edit.) "Immunodiffusion" Academic Press, New York, 1961,p.71,-90.
16. D'Andrea A.J., Torres Leedham V. M., Castagnino J. M. "Isoelectrofocusing in agarose: clinical applications" Electrophoresis 1985; 6:468,-472.
17. Dische Z.In: Methods of Biochemical Analysis. Vol. 2.Edic. D. Glick, New York, 1955; 200,-220.
18. Frugoni C. In: Alergia Clínica. Hansen K., Werner M., Barcelona, Salvat, 1970; 586,-600.
19. Gleich G.J., Larson J.B. "Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST". J. Allergy Clin. Immunol.1974;58:113,-120.
20. Irañeta S.G., Duschak V., Seoane M.A., Alonso A. "Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts" J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1999; 9: 235,-240.
21. King C. "The isolation and characterization of a novel collagenolytic serin protease allergen from the dust-mite". J. Allergy Clin. Immunol. 1996; 98:739,-747.
22. Laemmli U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature, 1970; 227: 680,-688.
23. Ouchterlony O. "Diffusion in gel methodsfor immunological analysis". Progr. Allergy, 1958; 5:1,-9.
24. Reinhart M.P., Malamud D. "Protein transfer of electrofocusing gels: the native blot". Anal.Biochem., 1982; 123: 229,-238.
25. Rohr A.S., Marshal N.A., Saxon A. "Successful immunotherapy for *Triatoma protracta* inducedanaphylaxis". J. Allergy Clin. Immunol.1984; 73: 369,-371.
26. Towbin H., Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979; 9:4350,-4355.
27. Voorhost R., Spieskma F. "Is a mite (*Dermatophagoides* spp) the producer of the house dust allergen?".Allergy Asthma, 1964; 10: 329,-333.

28. Alonso A., Potenza M., Rodríguez S.R.: "Las proteasas de los insectos como inductoras de hipersensibilidad en los humanos," *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 2003; 232: 23,-39.
29. Alonso A., Potenza M., Mouchian K., Albónico J., Pionetti C.: "Proteinase and gelatinolytic properties of a *Triatoma infestans* extract". *Allergol et Immunopathol.*, 2004; 32 (4), 223,-227.
30. Alonso A., Albónico J., Rodríguez S., Mouchián K., Scavini L.: "Cross reactivity between the antigens of *Periplaneta americana* and *Triatoma infestans*". *J.Invest. Allergol.Clin.Immunol.*, 1996; 6:301,-306.
31. Bernton H.: Cockroach asthma. *Brit. J. Dis. Chest.*, 1972; 66:611,-615.
32. Chang J.L.: Comparison of diagnostic tests for cockroach sensitivity among asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984 (Abst.), 73: 153.
33. Kang B.: Study on cockroach antigen as a probable causative agent in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1976; 58:357,-366.
34. Kang B.: A comparative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house-dust-antigens. *Ann. Allergy*, 1978; 41:333,-338.
35. Kang B: Cockroach cause of allergic asthma. *J. Allergy Clin.Immunol.*,1979;63:80,-88.
36. Khan A.H.: Comparison of allergenicity of whole body and body parts of german and American cockroach. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984; 73:144,-150.
37. Richman P.: The important sources of german cockroach allergens as determined by RAST analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984; 73:590,-598.
38. Fernández M., Martínez D., Tantaleán M.: Parásitos presentes en *Periplaneta americana* Linnaeus "Cucaracha doméstica" de la ciudad de Ica. *Rev. Per. Biol.*, 2001; 8: (2): 1,-7.
39. Baena Cagnani, C.E., Fernández A., Patiño C.M., Salvucci K.: Reactividad cutánea a *Periplaneta americana* y *Blattella germanica* en pacientes asmáticos. *Arch. arg.alerg. inmunol. clin.*, 1993; 24(4):180,-185.
40. Albónico J.F.: "Propiedades inmunoquímicas de las fracciones solubles de la *Periplaneta americana*". Tesis de Doctorado. *Bibliot. Fac. Med.*, 1984.
41. Brenner R.: Las lipoproteínas hemolinfáticas de insectos. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 1997; 227: 139,-155.

+++++\*\*\*\*\*+++++



## MICETISMOS. (PARTE 1): SÍNDROMES CON PERÍODO DE LATENCIA TARDÍA

Alicia B. Pomilio<sup>a</sup>, Stella M. Battista<sup>b</sup>, Angel Alonso<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Química y Bioquímica Estructural, CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Hosp de Clínicas, UBA, SCA, ANCBA.

**Título en inglés:** Mushroom poisonings. Part 1: late-onset syndromes

### Resumen

Los hongos son de valor nutricional, organoléptico y comercial, pero también contienen sustancias tóxicas que dan lugar a micetismos, cuyo tratamiento requiere el conocimiento del toxíndrome para poder lograr el tratamiento adecuado. En esta serie de tres artículos se clasifican los micetismos en base al período de latencia, que es el tiempo transcurrido desde la ingestión hasta la aparición de los síntomas, en intoxicaciones tardías, demoradas o retrasadas y tempranas o precoces. En esta parte 1 se analizan los siguientes síndromes con latencia tardía: **a) Hepatotóxico o por ciclopéptidos (micetismo por amatoxinas).** **b) Nefrotóxico (micetismo por Amanitas nefrotóxicas).** **c) Acromelalgia (eritromelalgia).** **d) Neurotóxico epileptogénico (micetismo por giromitrina).** **e) Cerebeloso (micetismo por *Morchella* spp.).** **f) Encefalopático o neurotóxico tardío (micetismo por *Hapalopilus rutilans*).** La toxicidad tardía engloba los síndromes potencialmente más graves, cuyos síntomas surgen entre 6 y 24 horas después de la ingestión. Para cada síndrome se da a conocer el tiempo de latencia, la sintomatología, las toxinas y el mecanismo de acción (cuando se conocen), y por último las especies de macromicetos involucradas. A veces, si es necesario, se discute la toxicodinamia y las metodologías de análisis. En la última sección se discuten los tratamientos generales, y más en detalle, los tratamientos para contrarrestar los micetismos debidos a amatoxinas y a giromitrina, que han sido los más estudiados de todos los analizados en esta parte 1. Esta información es considerada de valor para el conocimiento de los bioquímicos clínicos, así como médicos toxicólogos y personal de salud de unidades de emergencia.

**Palabras clave:** micetismos \*clasificación \*período de latencia\*toxíndromes\* síndrome con latencia tardía\*toxinas\*mecanismos de acción\* tratamientos

### Abstract

Mushrooms are of nutritional, organoleptic, and commercial value, but also contain toxic substances that give rise to the so-called mushroom poisoning (mycetism), whose medical management requires the knowledge of the toxin in order to achieve the appropriate therapy. In this series of three articles mushroom toxidromes are classified based on the latency period, which is the time elapsed from ingestion to the onset of symptoms, in late-, delayed-, and early-onset intoxications. In this part 1, the following late-onset syndromes are analyzed: (a) Hepatotoxicity or cyclopeptide syndrome due to amatoxins. (b) Nephrotoxicity or *Amanita* nephrotoxic syndrome. (c) Acromelalgia (erythromelalgia). (d) Epileptogenic neurotoxicity or giromitric syndrome. (e) Cerebellar syndrome due to *Morchella* spp. (f) Late encephalopathic or neurotoxic syndrome due to *Hapalopilus rutilans*. Late toxicity comprises potentially more severe syndromes, whose symptoms appear between 6 and 24 hours after ingestion. For each syndrome, latency time, symptomatology, toxins and the mechanism of action (when known) are analyzed, together with the species of macromycetes involved. Sometimes, if necessary, toxicodynamics and

methodologies of analysis are displayed. In the last section general mushroom poisoning management is discussed, and in detail, the therapy to counteract mycetism due to amatoxins and gyromitrin, which have been the most studied of all mushroom poisonings analyzed in this part 1. This information is considered valuable for the knowledge of clinical biochemists, as well as medical toxicologists, and health staff of emergency units.

**Key words:** mycetism \* classification \* latency period \* toxidromes \* late-onset syndromes \* toxins \* action mechanisms\* treatments

## 1. Introducción

Es ya costumbre incluir en almuerzos y cenas algún plato que en su elaboración incluya hongos, ya sea salsas con “*champignons*” para acompañar carnes al estilo francés, o bien verduras cortadas en juliana, mezclada con hongos al estilo chino, además de la clásica ensalada de hongos frescos, solos o con vegetales. En la búsqueda de una alimentación “natural”, como sinónimo de “sana”, se incrementa la incorporación de hongos, por sus propiedades nutricionales y terapéuticas, fomentando la recolección de los silvestres. Así surgen los micetismos y la realidad que lo natural no es siempre sinónimo de inocuidad.

Existe un número importante de consultas al año por la ingesta de hongos silvestres causantes de intoxicación, por lo que es importante conocer en detalle las especies causantes de síndromes de intoxicación con el fin de alertar a consumidores de hongos silvestres y a los profesionales de la salud de su existencia. Los diversos micetismos son ampliamente conocidos en la literatura, así como gran parte de los compuestos químicos presentes en los hongos superiores (Macromicetos) (1,-12). Se han realizado varios trabajos en nuestros laboratorios sobre las conformaciones, estructuras y estudios *ab initio* de los ciclopéptidos de *Amanita phalloides* y derivados (13,-16) sobre su reactividad cruzada con otras toxinas (17) y estudios de relación estructura actividad (QSAR, sigla del inglés: *quantitative structure-activity relationship*) y de bioactividad de éstos y otros ciclopéptidos (18,-20).

Para evitar intoxicaciones, sobre todo aquellas que puedan llevar a internaciones y terminar en trasplante y/o muerte, es necesario ser prudentes en la recolección de hongos silvestres y conocer qué síndromes son provocados por determinados hongos, cuáles son las posibles toxinas y si existen tratamientos adecuados para contrarrestar su acción.

## 2. Clasificación de los toxíndromes

1. Primeramente se debe tener en cuenta que en los hongos superiores, Macromicetos, lo que se recolecta para el consumo corresponde a los cuerpos fructíferos (carpóforos) de los hongos, que en castellano se denominan “setas” (en inglés: “*mushrooms*”) y el organismo completo “hongo” (en inglés: “*fungus*”), pero que en Argentina llamamos indistintamente “hongo”. Se conocen trabajos con el listado de los Agaricales argentinos correspondientes a las familias *Amanitaceae*, *Pluteaceae* e *Hygrophoraceae* (21); *Coprinaceae* y *Strophariaceae* (22); *Bolbitaceae* y *Crepidotaceae* (23); *Tricholomataceae* (24); *Agaricaceae* (25); *Paxillaceae*, *Gomphidiaceae*, *Boletaceae* y *Russulaceae* (26); *Cortinariaceae* y *Entolomataceae* (27), entre otros. A través de los años, se han aislado e identificado distintos tipos de compuestos de los hongos, destacándose compuestos terpenoidales, esteroides, lectinas, compuestos fenólicos, alcaloides, péptidos, ciclopéptidos, polipéptidos y proteínas, responsables de diversas propiedades medicinales, como actividad antitumoral, antiinflamatoria, antifúngica, antimicrobiana, antiviral y nematocida (28). Recientemente se ha publicado una revisión sobre alcaloides indólicos de hongos (12). También se ha visto

la importancia de la determinación de las esporas de hongos en investigaciones criminales forenses (29). En el presente trabajo nos interesan los compuestos presentes en los carpóforos que resultan tóxicos para el hombre, con variados mecanismos de acción. La clasificación de los micetismos provocados por los carpóforos se puede realizar tomando como base el tipo de compuesto tóxico que poseen, o bien, según el síndrome que provocan por ingestión, más concretamente toxíndrome (conjunto de signos y síntomas que presenta el paciente, provocado por uno o varios compuestos tóxicos) (30). Resulta muy adecuado hacer una primera división de los toxíndromes teniendo en cuenta el ***tiempo de incubación o período de latencia***, que es el tiempo transcurrido desde la ingestión de los hongos hasta la aparición de los primeros síntomas, pues ayuda a establecer el diagnóstico y por ende, el tratamiento inicial. Es necesario aclarar que ese tiempo de incubación puede variar entre individuos, que se trata de una apreciación personal y que el registro que se hace en las unidades de emergencia a veces no es suficientemente preciso. Por lo tanto, la inclusión de los síndromes en cada grupo se ve afectada, sobre todo en los tardíos y demorados. Anteriormente (2), se clasificaron los micetismos en dos grandes grupos tomando como referencia la latencia mayor o menor de seis horas y se enumeraron las especies más frecuentemente involucradas. En el presente trabajo se consideran también los tiempos de latencia demorados o retrasados, teniendo entonces tres grandes grupos de clasificación: Toxíndromes con un período de latencia mayor de 6 horas, preferentemente entre 6 y 24 horas después de la ingestión de los carpóforos. Toxíndromes con un período de latencia superior o igual a un día después de su ingestión. Toxíndromes con un período de latencia inferior a 6 horas tras su ingestión.

En el ***grupo 1*** se encuentran los siguientes micetismos tardíos:

- a) Toxíndrome hepatotóxico o ciclopeptídico. Micetismo por amatoxinas.
- b) Toxíndrome nefrotóxico. Micetismo por Amanitas nefrotóxicas.
- c) Toxíndrome con acromelalgia (eritromelalgia).
- d) Toxíndrome giromitrínico o neurotóxico epileptogénico. Micetismo por giromitrina.
- e) Toxíndrome cerebeloso. Micetismo por *Morchella* spp.
- f) Toxíndrome encefalopático o neurotóxico tardío. Micetismo por *Hapalopilus rutilans*.

En el ***grupo 2*** se encuentran los siguientes micetismos demorados:

- g) Toxíndrome nefrotóxico retrasado u orellánico. Micetismo por orellanina.
- h) Toxíndrome con rabdomiólisis. Micetismo por *Tricholoma equestre*.
- i) Toxíndrome encefalopático o neurotóxico retrasado. Micetismo por *Pleurocybella porrigens*.
- j) Toxíndrome cardiovascular. Micetismo por *Trogia venenata*.

En el ***grupo 3*** se encuentran los siguientes micetismos tempranos:

- k) Toxíndromes gastrointestinales o resinoides.
- l) Toxíndrome muscarínico o sudoriano
- m) Toxíndrome inmunohemolítico o hemolítico. Micetismo por *Paxillus*.
- n) Toxíndrome pneumónico alérgico. Licoperdonosis o micetismo por *Lycoperdon*.
- o) Toxíndrome panterínico o delirante. Micetismo por derivados isoxazólicos.
- p) Toxíndrome coprínico o cardiovascular.
- q) Toxíndrome psicotrópico o alucinogénico. Micetismo por derivados indólicos.
- r) Toxíndrome agudo de rabdomiólisis. Micetismo por *Russula subnigricans*.

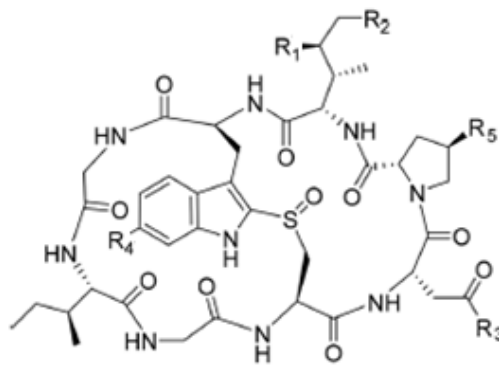
**GRUPO 1: Micetismos tardíos : Toxíndrome hepatotóxico o ciclopeptídico. Micetismo por amatoxinas:**

**Período de latencia:** Suele ser de 8 a 24 horas. Los síndromes de aparición tardía (> 6 horas) ocurren principalmente después de la ingestión de hongos letales (31).

**Sintomatología:** Este micetismo consta de 3 fases: intestinal, de mejoría aparente y de lesión hepática (32). Durante la fase intestinal, los síntomas son: malestar, calambres abdominales, gastroenteritis, diarrea, a veces sanguinolenta, y vómitos severos. Se observa una importante pérdida de líquidos que provoca deshidratación. Esta primera fase puede ser causa de muerte (paro cardíaco o shock vascular) si la persona intoxicada no se pone en tratamiento. Aproximadamente a los dos días de la ingestión de los carpóforos los síntomas desaparecen durante algunas horas (fase de mejoría aparente), lo cual hace pensar a la persona intoxicada que se encuentra fuera de peligro, pero sufre una recaída de 3 a 5 días después de la ingestión. La tercera fase es la hepatotóxica que aparece hacia el tercer día después de la ingestión. Esta es la fase más grave, de marcada insuficiencia hepática.

Aproximadamente, una semana después de la ingestión, y debido a hemorragias internas o coma hepático, se puede producir la muerte. Hace unos años se analizó el efecto de la ingestión de *Amanita phalloides* sobre las funciones cardíacas en una paciente intoxicada con este hongo, complicada con insuficiencia multiorgánica y shock cardiogénico debido a una disfunción sistólica ventricular izquierda avanzada (33). Posteriormente, tres pacientes intoxicados también sufrieron deterioro cardíaco transitorio con compromiso de la función sistólica ventricular izquierda, además de otras manifestaciones (34). Se logró un tratamiento efectivo, con la consiguiente recuperación de los pacientes intoxicados.

## Amatoxinas

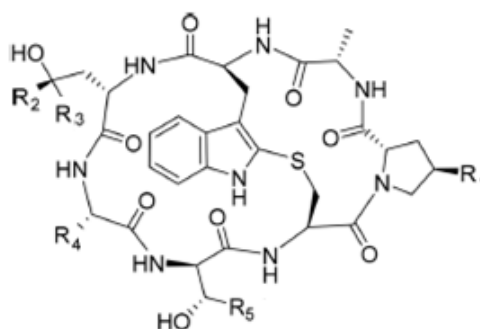


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>α-Amanitina</b>	OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH
<b>β-Amanitina</b>	OH	OH	OH	OH	OH
<b>γ-Amanitina</b>	OH	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH
<b>ε-Amanitina</b>	OH	H	OH	OH	OH
<b>Amanulina</b>	H	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH
<b>Ácido amanulínico</b>	H	H	OH	OH	OH
<b>Amaninamida</b>	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H	OH
<b>Amanina</b>	OH	OH	OH	H	OH
<b>Proamanulina</b>	H	H	NH <sub>2</sub>	OH	H

Figura 1: Estructuras químicas de las amatoxinas.

**Toxinas: Los compuestos tóxicos son:** amatoxinas, falolisina, falotoxinas y virotoxinas (35-38). El subgrupo más grande es el de las nueve **amatoxinas** (α-, β-, γ- y ε-amanitinas, amanulina, ácido amanulínico, amaninamida, amanina y proamanulina) (39) (Fig. 1) que son octapéptidos bicíclicos y se han identificado en 35 especies de hongos de los géneros *Amanita*, *Galerina* y *Lepiota* (40-42). La primera amatoxina que se aisló fue α-amanitina por Wieland y sus colaboradores en 1941 (36, 43). Siete de las amatoxinas (α-, β-, γ- y ε-amanitinas, amanulina, ácido amanulínico y proamanulina) contienen una rara subestructura de 6-hidroxi-*L*-triptofano. Las amatoxinas son las únicas de esos compuestos que son tóxicas por vía oral y por lo tanto, responsables de los micetismos (44-48). Las amatoxinas son absorbidas en el tubo digestivo, son termoestables (no se destruyen por cocción) y no son volátiles (no se destruyen por desecación).

## Falotoxinas



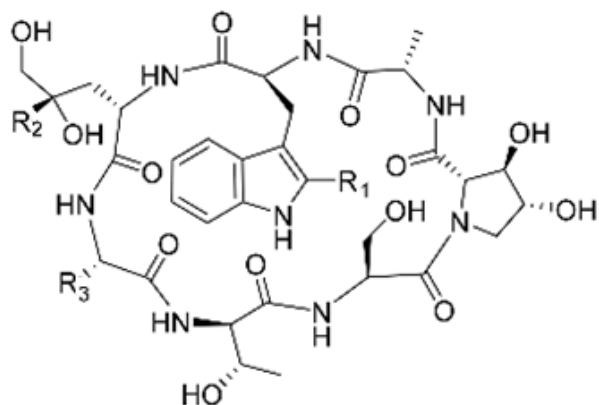
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Faloidina</b>	OH	Me	CH <sub>2</sub> OH	Me	Me
<b>Profaloína</b>	H	Me	Me	Me	Me
<b>Faloína</b>	OH	Me	Me	Me	Me
<b>Falisina</b>	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	Me	Me
<b>Falacidina</b>	OH	Me	CH <sub>2</sub> OH	CHMe <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H
<b>Falacina</b>	OH	Me	Me	CHMe <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H
<b>Falisacina</b>	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	CHMe <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H

**Figura 2: Estructuras químicas de las falotoxinas.**

Las **falotoxinas** (faloidina, profaloína, faloína, falisina, falacidina, falacina, falisacina) (Fig. 2) son heptapéptidos bicíclicos muy relacionados con las amatoxinas y también se aislaron del género *Amanita* (36, 49). Faloidina fue el primer péptido tóxico que se aisló de este género en 1937 (50). Si bien son extremadamente tóxicas cuando se administran por vía intravenosa, no lo son por vía oral ya que **no** son absorbidas por el aparato digestivo y por lo tanto no son causa de la intoxicación humana por ingestión de los hongos (12, 50, 51).

Las **virotoxinas** (viroidina, desoxoviroidina, alaviroidina, aladesoxoviroidina, viroisina, desoxoviroisina) (Fig. 3) son péptidos tóxicos que se encuentran singularmente en los hongos *Amanita virosa* (52) y recientemente se encontraron en *Amanita subpallidorosea* (53). A diferencia de las falotoxinas que son bicíclicas, las virotoxinas son heptapéptidos monocíclicos y contienen *D*-serina en lugar de *L*-cisteína. Además, las virotoxinas poseen dos aminoácidos que no se habían encontrado anteriormente en la naturaleza: 2,3-*trans*-3,4-dihidroxi-*L*-prolina y 2'-(metilsulfonyl)-*L*-triptofano (54). Las virotoxinas, como las falotoxinas, sólo son tóxicas por vía endovenosa (36). Recientemente se ha estudiado la biosíntesis de los ciclopéptidos tóxicos de *Amanita* (55).

### Virotoxinas



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Viroidina</b>	<b>SO<sub>2</sub>Me</b>	<b>Me</b>	<b>CHMe<sub>2</sub></b>
<b>Desoxoviroidina</b>	<b>SOMe</b>	<b>Me</b>	<b>CHMe<sub>2</sub></b>
<b>Alaviroidina</b>	<b>SO<sub>2</sub>Me</b>	<b>Me</b>	<b>Me</b>
<b>Aladesoxoviroidina</b>	<b>SOMe</b>	<b>Me</b>	<b>Me</b>
<b>Viroisina</b>	<b>SO<sub>2</sub>Me</b>	<b>CH<sub>2</sub>OH</b>	<b>CHMe<sub>2</sub></b>
<b>Desoxoviroisina</b>	<b>SOMe</b>	<b>CH<sub>2</sub>OH</b>	<b>CHMe<sub>2</sub></b>

Figura 3: Estructuras químicas de las virotoxinas.

Otro grupo de ciclopéptidos, **antamanida** y **cicloamanidas A-D** (Fig. 4), también son producidos por *Amanita phalloides*. La antamanida es un ciclopéptido que contrarresta a la faloidina (35). La química, bioquímica y aspectos biológicos moleculares de los ciclopéptidos tóxicos en *Amanita* fueron tratados por Wieland (50).

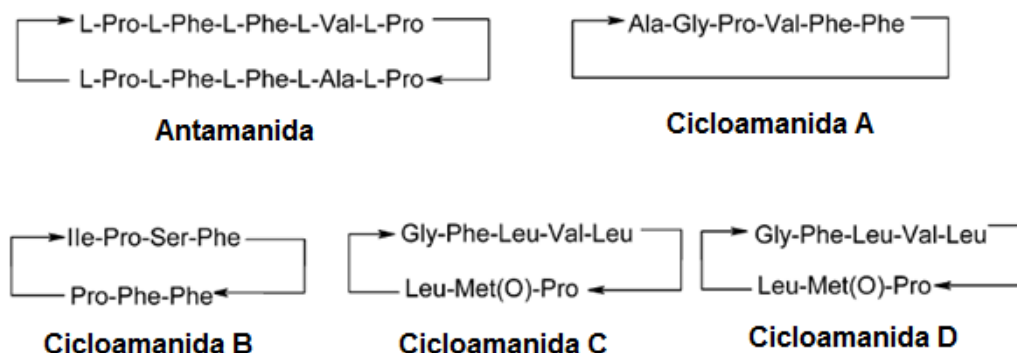


Figura 4: Otros ciclopéptidos presentes en *Amanita phalloides*: Antamanida y cicloamanidas A-D.

También de extractos acuosos de *Amanita phalloides* se aisló una hemolisina tóxica denominada **falolisina**, que es una mezcla de dos o tres proteínas citolíticas de estructura similar, cada una con un peso molecular de 34 kDa. Ha demostrado actividad hemolítica *in vitro*. Dado que el jugo gástrico del estómago destruye esta toxina, no hace daño por vía oral



(35). También se aisló **toxofalina**, que es una proteína tóxica del cuerpo fructífero de *Amanita phalloides* y se caracterizaron sus principales propiedades fisicoquímicas y biológicas (56). Esta proteína posee una masa molecular de 55 kDa y un punto isoeléctrico  $pI$  5,7 y se expresa predominantemente en el tallo del carpóforo. Como se evaluara mediante experimentos de entrecruzamiento, toxofalina forma un complejo trimérico en solución con buffer. Induce la apoptosis en varias líneas celulares de mamíferos (L1210 y CCL-64 murinas, y A549 humanas) con  $IC_{50}$  de 0,25-0,45  $\mu\text{g/mL}$ . Las características fisicoquímicas, químicas y biológicas de toxofalina difieren claramente de las de falolisina. Toxofalina induce la fragmentación del ADN y los cambios morfológicos en los núcleos de las células diana (condensación de cromatina y fragmentación de núcleos), que son características de la apoptosis. El inhibidor de caspasa III (Boc-D-fmk: benciloxycarbonil-Asp(OMe)-fluorometil-cetona) no inhibe la fragmentación apoptótica del ADN inducida por toxofalina, lo que sugiere que esta toxina implica una vía de apoptosis independiente de la caspasa (56). Sin embargo, recientemente se demostró que las *L*-aminoácido-oxidasas de *Amanita phalloides* y *Clitocybe geotropa* inducen apoptosis dependiente de caspasas (57); estas *L*-aminoácido-oxidasas inducen apoptosis en líneas celulares cancerosas Jurkat a través de las vías intrínseca y extrínseca, si bien el aumento significativamente mayor de caspasa 9 sobre la actividad de caspasa 8 sugiere que es la vía intrínseca el modo predominante de la apoptosis inducida por estas oxidasas (57). Se demostró anteriormente que la interacción de toxofalina con las células diana no está mediada por un receptor específico de la superficie celular (56). La estructura primaria de toxofalina se estudió parcialmente a través de la secuenciación directa de sus péptidos tripticos, seguida por la clonación basada en PCR del cDNA correspondiente (58). Una búsqueda bioinformática subsiguiente reveló una homología estructural de toxofalina con la *L*-aminoácido-oxidasa del hongo *Laccaria bicolor*. También se encontró una amplia especificidad de sustrato de toxofalina con respecto a la oxidación de aminoácidos seleccionados. El ácido ascórbico inhibió el efecto citotóxico de toxofalina, muy probablemente como resultado de la captación de peróxido de hidrógeno, que es el producto de la catálisis de las oxidasas.

Por lo tanto, además de los ciclopéptidos altamente tóxicos y la lectina tóxica falolisina, *A. phalloides* contiene toxofalina que es una proteína citotóxica con propiedades de la enzima *L*-aminoácido-oxidasa. Varios basidiomicetos presentan actividad de *L*-aminoácido-oxidasas con amplia especificidad de sustrato y una variedad de masas moleculares aparentes que varían de 25 a 200 kDa, siendo más activas a pH 5,5 que a pH 8.0 (59). También se han aislado e identificado compuestos de bajo peso molecular como el **ácido (2*S*,4*S*)-4-hidroxi-2-pirrolidincarboxílico** y el **ácido (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihidroxi-2-pirrolidincarboxílico** (Fig. 5) en *Amanita phalloides* y *A. verna* respectivamente (5).

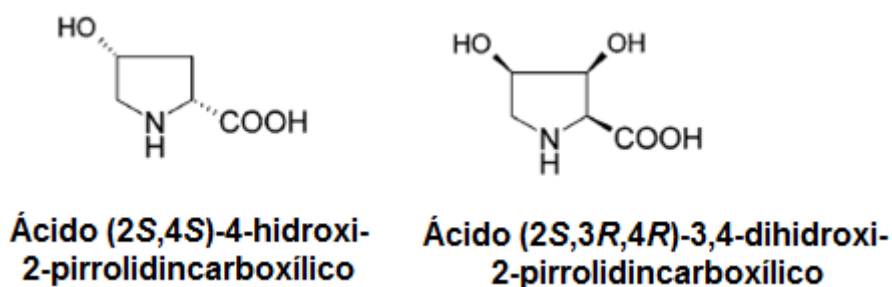


Figura 5: Estructuras químicas de los ácidos hidroxipirrolidincarboxílicos presentes en *Amanita phalloides* y *A. verna*.

1. **Mecanismo de acción:** Las **amatoxinas** son un grupo de toxinas hepatotóxicas, de efectos mortales incluso a dosis mínimas.  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -Amanitinas se han identificado como los miembros más potentes de esta familia de compuestos, con valores de  $DL_{50}$  en el rango de 0,2 a 0,5 mg/kg (36). Las **falotoxinas** no son tóxicas por vía oral, sino por vía endovenosa, dañan los hepatocitos, interactúan con la F-actina celular e interrumpen la despolimerización de los microfilamentos (51, 60). Esta interacción con actina ha hecho que se use faloidina en la investigación biomédica, con análogos fluorescentes que se utilizan para visualizar los filamentos de actina en células vivas y fijas, así como *in vivo* (61). Cuando se inyectan en ratones, las falotoxinas son 10 veces más letales que el cianuro: su  $DL_{50}$  es de 2 mg/kg. En cambio, las amatoxinas son mucho más mortales y son activamente tóxicas por vía oral ( $DL_{50} = 0,1$  mg/kg). La actividad biológica de **viroisina** es comparable a la de las falotoxinas, ya que su  $DL_{50}$  es de 2,5 mg/kg (ratón blanco), causando la muerte de los animales dentro de las 2-5 horas, por hemorragia hepática (54). Además, a nivel molecular, las virotoxinas se comportan de manera similar a las falotoxinas. Así, viroisina se une a la actina del músculo de conejo, como se demostrara por espectroscopía UV diferencial. Con una constante de equilibrio aparente de disociación  $K_D \sim 2 \times 10^{-8}$  M, la afinidad de viroisina es muy similar a la de faloidina. Sin embargo, la flexibilidad de la estructura monocíclica y la presencia de dos grupos hidroxilo adicionales en las virotoxinas sugieren un modo diferente de interacción con actina. Si bien hay pruebas de que las falotoxinas bicíclicas poseen un sitio de unión rígido, las virotoxinas pueden adoptar la conformación biológicamente activa mediante un mecanismo de ajuste inducido por contacto con la actina (54). Se realizó un estudio sobre la reacción hepática de ratones a la intoxicación aguda con virotoxinas y faloidina, péptidos cíclicos aislados del hongo *Amanita virosa* (51). Las fracciones purificadas se administraron por vía intraperitoneal a varias dosis para determinar la  $DL_{50}$  que varió de 1,0 a 5,3 mg/kg, siendo viroidina, faloidina y viroisina las más potentes. Las virotoxinas y la faloidina indujeron necrosis hemorrágica del hígado. El desarrollo de lesiones hepáticas fue seguido por una actividad aumentada de alanina-aminotransferasa (ALT) sérica, así como por cambios detectados en microscopio óptico y electrónico. En grupos adicionales, los conductos biliares se canularon y se recogió bilis durante 2 horas después de la inyección de los péptidos (1 mg/kg) para determinar su potencial colestásico. Los primeros cambios en los hepatocitos fueron la invaginación de la membrana plasmática y la formación de vacuolas citoplásmicas. En períodos posteriores, la acumulación de eritrocitos fue evidente en las vacuolas y en el citoplasma. La gravedad del daño hepático, según el análisis morfológico, se correlacionó con la actividad de ALT sérica. Dos de los péptidos ensayados (viroisina y faloidina) disminuyeron el flujo biliar en más del 50% sobre los controles. Durante el desarrollo de la colestasis se observaron alteraciones ultraestructurales leves en el polo canalicular biliar de los hepatocitos. Dado que las virotoxinas, como la faloidina, están unidas a la actina, es posible que su afinidad por la actina celular pueda ser responsable de su hepatotoxicidad (51). Las amatoxinas, especialmente las que poseen la subestructura de 6-hidroxi-*L*-triptofano, actúan como inhibidores selectivos de la ARN polimerasa II, una enzima vital en la síntesis del ARNm (36, 62). Principalmente,  $\alpha$ -amanitina y  $\beta$ -amanitina, actúan bloqueando el complejo de ARN-polimerasa II, que da como resultado la inhibición de la transcripción de ADN (paso de ADN a ARNm) y de los procesos de síntesis de proteínas esenciales, conduciendo a la muerte de los hepatocitos (63).  $\alpha$ -Amanitina también es un fuerte inductor de apoptosis y

puede jugar un rol significativo en la patogénesis del daño hepático en el curso de la intoxicación con amatoxinas. Los datos cristalográficos de rayos X presentados por Bushnell *et al.* (64) exploraron en detalle el mecanismo de unión de  $\alpha$ -amanitina a ARN polimerasa II. Esa unión previene los cambios conformacionales necesarios para realizar la transcripción, reduciendo así la translocación del ADN de varios miles a un puñado de nucleótidos por minuto. Si bien la inhibición de la síntesis de proteínas causa daño generalizado en el cuerpo humano, son lesiones irreversibles en las células cardíacas y hepáticas, que resultan fatales (60). El hígado es el principal órgano afectado, ya que es el primer órgano con el que entra en contacto la toxina después de su absorción por el tracto intestinal (65).

**Especies causantes del micetismo por amatoxinas:** Reino: Fungi; División: Basidiomycota; Clase: Agaricomycetes; Orden: Agaricales; Familia: *Amanitaceae*: *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. (Basónimo: *Agaricus phalloides* Vaill. ex Fr.) (“sombbrero de la muerte”) (sección *Phalloideae*) (crece en Argentina: Entre Ríos, Santa Fe, Buenos Aires, Mendoza, Río Negro) ha sido implicada en la mayoría de las muertes por su consumo (2, 21, 66); *Amanita ameghinoi* (Speg.) Singer (Bas.: *Armillaria ameghinoi* Speg.) (sección *Lepidella*) crece en Argentina: Tucumán, Catamarca y Buenos Aires (21, 66); *Amanita phalloides* var. *alba*; *Amanita bisporigera* (67); *Amanita exitialis* (sección *Phalloideae*) del este de Asia (68); *Amanita fuliginea* (se describió originalmente en Japón y es responsable de la mayoría de las intoxicaciones fatales en el sur de China) (69); *Amanita subpallidrosea* (especie letal recientemente descubierta en China, de *Amanita* sección *Phalloideae*, que se agrupa con *A. virosa* en el mismo clado según el análisis filogenético molecular) (53); *Amanita porrinensis*; *Amanita verna* (46, 70); *Amanita verna* var. *decipiens*; *Amanita virosa*. Familia: *Cortinariaceae*: *Galerina marginata* (Batsch) Kühner (Bas.: *Agaricus marginatus* Batsch) (crece en Argentina: Tucumán) (27, 66). Familia: *Agaricaceae*: *Lepiota brunneoincarnata*; *Lepiota brunneolilacea*; *Lepiota castanea*; *Lepiota cristata* (Bolton) P. Kumm. (Bas.: *Agaricus cristatus* Bolton) (crece en Argentina: Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Córdoba) (2, 25, 66); *Lepiota cristata* var. *vicarii* (Raithelh.) Raithelh. (crece en Argentina: Buenos Aires) (25, 66); *Lepiota helveola* Bres. (crece en Argentina: Misiones, Buenos Aires) (71-73) pertenece al grupo de las pequeñas lepiotas blancas, muy tóxicas, y se confunde por su parecido con *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer comestible, que crece en Buenos Aires (25), pero esta última tiene una talla muy superior; *Lepiota kuehneri*; *Lepiota lilacea*; *Lepiota pseudohelveola*; *Lepiota subincarnata* J.E. Lange (= *Lepiota josserandii* Bon & Boiffard) (crece en Buenos Aires) (2, 25, 66); *Macrolepiota neomastoidea* (Hongo) Hongo (Bas.: *Lepiota neomastoidea* Hongo) (74). Familia: *Bolbitiaceae*: *Conocybe filaris* (Fr.) Kühner (Bas.: *Agaricus togularis* var. *filaris* Fr.; Sin. = *Pholiotina filaris* (Fr.) Singer) (crece en Argentina: Tucumán, Buenos Aires) (2, 23, 47, 65, 66). Los llamados “pequeños hongos marrones” (LBMs: *Little Brown Mushrooms*) son de pequeño tamaño y crecen en grupo; comprenden hongos inofensivos y hongos tóxicos que causan náuseas o problemas gástricos. Algunos que contienen amatoxinas son especies del género *Galerina*. Antiguas especies como *Galerina autumnalis*, *Galerina oregonensis*, *Galerina unicolor* y *Galerina venenata* ahora todas tienen el mismo nombre: *Galerina marginata*, dado que las pruebas genéticas demostraron que todos son iguales. *Galerina marginata* se encuentran en Europa, América del Norte, Asia y Australia, es hepatotóxica y finalmente causa la muerte si no se trata de inmediato. Se confunde con hongos comestibles, como “el hongo de la miel” (*Armillaria mellea*), “enokitake” (*Flammulina velutipes*) o el alucinógeno *Psilocybe cubensis*. Todas las

especies del género *Galerina* son saprófitos o saprobios, ya que crecen en madera muerta o en descomposición, generalmente coníferas.

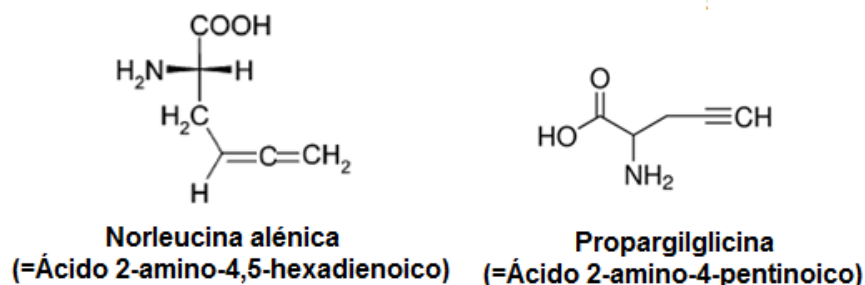
### **Toxíndrome nefrotóxico. Micetismo por Amanitas nefrotóxicas:**

**Período de latencia:** Entre 8 y 14 horas después de la ingesta.

**Síntomatología:** En los casos leves, se manifiesta con trastornos digestivos, vómitos y diarrea. La gastroenteritis puede provocar una gran pérdida de volumen de fluidos. En otros casos más serios, se inicia con síntomas gastrointestinales 1-12 horas después de la ingestión, seguidos de una insuficiencia renal aguda grave de aparición tardía, después de 2-6 días, habiendo sido necesarias hasta 9 sesiones de hemodiálisis para lograr la normalización de la persona intoxicada (31, 75, 76). Ha habido un caso de envenenamiento con *Amanita pseudoporphyria* por nefrotoxinas, presentando insuficiencia renal aguda de aparición tardía asociada con la ingestión de este hongo, en un hombre con diabetes de 66 años. Los efectos fueron similares a los síntomas de intoxicación asociados con las especies *Amanita smithiana* norteamericana y *Amanita proxima* mediterránea. La biopsia renal del paciente mostró necrosis tubular aguda con anomalías glomerulares menores. El tratamiento incluyó un período de hemodiálisis de tres semanas, después del cual el paciente se recuperó completamente de la insuficiencia renal aguda en dos meses (77).

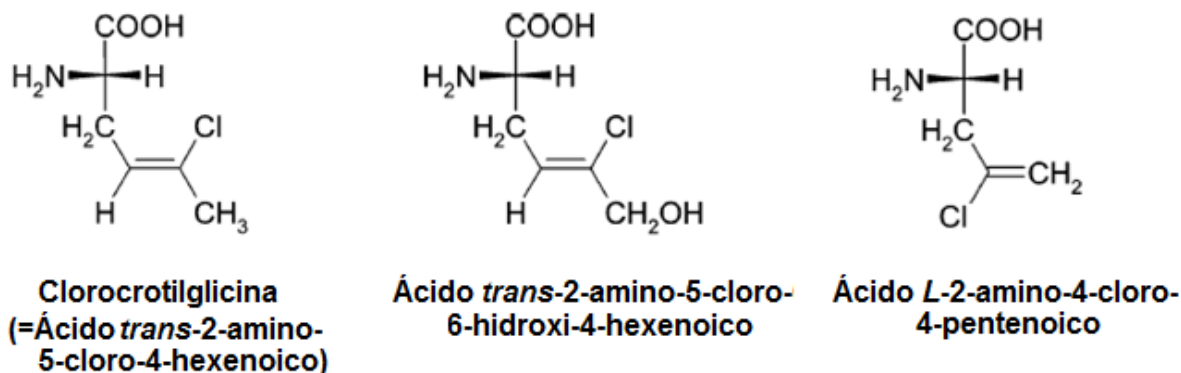
La intoxicación con *Amanita proxima* también se ha asociado con cardiotoxicidad (78).

**Toxinas:** La acción dañina sobre el riñón, parece deberse a la presencia de aminoácidos tóxicos, no proteicos, que contienen la subestructura de aleno, como **norleucina alénica** (ácido 2-amino-4,5-hexadienoico), y que contienen un grupo alquino, como **propargilglicina** (sinónimos: *DL*-propargilglicina; ácido 2-aminopent-4-inoico; ácido 2-amino-4-pentinoico) (Fig. 6), que se **encuentran en *Amanita proxima*** (0,25% en peso seco, de norleucina alénica). Norleucina alénica es nefrotóxica y propargilglicina es hepatotóxica. *Amanita boudieri* and *A. solitaria* (*A. echinocephala*) también contienen norleucina alénica (*A. boudieri*: ~1,2% en peso seco y *A. solitaria*: ~2,6% en peso seco).



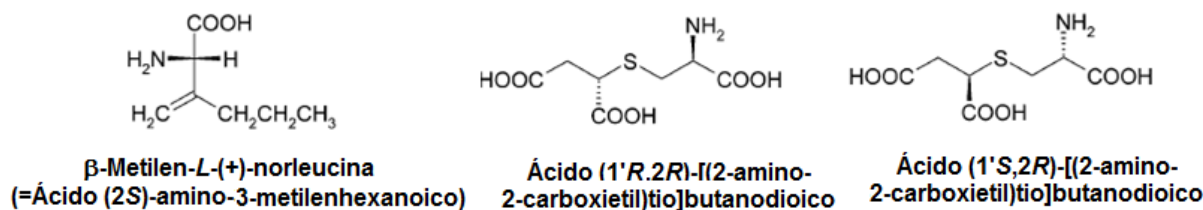
**Figura 6: Estructuras químicas de norleucina alénica y propargilglicina.**

También se han encontrado aminoácidos no proteicos clorados. Norleucina alénica, ácido *trans*-2-amino-5-cloro-4-hexenoico (**clorocrotilglicina**) y ácido *trans*-2-amino-5-cloro-6-hidroxi-4-hexenoico (Fig. 7) se obtuvieron de *Amanita solitaria* (*Amanita echinocephala*) (79). Norleucina alénica se encontró también en *A. pseudoporphyria* (80), junto con el **ácido *L*-2-amino-4-cloro-4-pentinoico** (Fig. 7). Norleucina alénica y clorocrotilglicina se encuentran en *Amanita smithiana* (81).



**Figura 7:** Estructuras químicas de clorocrotilglicina, ácido *trans*-2-amino-5-cloro-6-hidroxi-4-hexenoico y ácido *L*-2-amino-4-cloro-4-pentenoico.

También hay aminoácidos no proteicos con grupos metileno y con azufre en especies del género *Amanita*. Se ha encontrado ácido (2*S*)-amino-3-metilenhexanoico (**β-metilen-*L*(+)-norleucina**) (Fig. 8) en *Amanita vaginata* var. *fulva* (5). La especie *Amanita vaginata* y sus variedades generalmente se consideran comestibles, pero se han registrado intoxicaciones por ingestión posiblemente debidas a estos aminoácidos no comunes (82). Ácido (1'*R*,2*R*)-[(2-amino-2-carboxietil)tio]butanodioico y ácido (1'*S*,2*R*)-[(2-amino-2-carboxietil)tio]butanodioico (Fig. 8) se encontraron en *A. pantherina* (83).



**Figura 8:** Estructuras químicas de β-metilen-*L*(+)-norleucina, ácidos (1'*R*,2*R*)- y (1'*S*,2*R*)-[(2-amino-2-carboxietil)tio]butanodioicos.

**Mecanismo de acción:** La norleucina alénica y clorocrotilglicina producen un rápido daño renal, como la mayoría de los aminoácidos mencionados, excepto propargilglicina que es hepatotóxica. Propargilglicina es un inhibidor irreversible de la enzima cistationin-γ-liasa (GCL), una enzima clave implicada en la síntesis de glutatión y la vía de transulfuración metabólica que regula la concentración de homocisteína y media la síntesis de cisteína (84). Los tioaminoácidos encontrados en *A. pantherina* son antagonistas de los receptores de glutamato sensibles a *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) en membrana de cerebro de rata y motoneuronas espinales de rata (83).

2. **Especies causantes del micetismo:** *Amanita proxima* (*Amanita*, sección *Roanokenses*) provoca frecuentes intoxicaciones en Francia y en España, observándose un aumento de los casos con el tiempo (85). *Amanita boudieri* and *A. solitaria* (*A. echinocephala*) causan micetismos nefrotóxicos en Portugal y en Alemania respectivamente. *Amanita pseudoporphyria* crece de manera solitaria o gregaria en bosques de coníferas; originalmente descrita en Japón, ahora también se la conoce en el norte de India, Tailandia, Nepal y en el sur de China, donde se vende en mercados, junto con el hongo similar, *Amanita manginiana*. *Amanita smithiana* ha causado numerosas intoxicaciones en



EE.UU. (Oregon y Washington) (86), así como en el noroeste del Pacífico y en Taiwan (81), dado que se confunde con el popular hongo comestible *Tricholoma magnivelare* (“Matsutake”) (87). También producen este micestismo: *A. sphaerobulbosa* (Sudeste Asiático), *A. thiersii* (EE.UU.) y *A. pseudoporphyria* (Japón). En Argentina crece *Amanita vaginata* (Bull.) Lam. (Bas.: *Agaricus vaginatus* Bull.) en Tierra del Fuego (21).

**Toxíndrome con acromelalgia (eritromelalgia):**

El síndrome de eritromelalgia se ha descrito ya a fines del siglo XIX en Japón y Corea del Sur con *Clitocybe acromelalga*, y desde 1996 en Francia y luego en Italia con *C. amoenolens* (76).

**Período de latencia:** Larga, de hasta 24 horas, o más.

**Síntomatología:** Se presenta un cuadro de crisis de violentos dolores paroxísticos, acompañados de sensación de quemazón en las manos y sobre todo en los pies. Durante las crisis, las manos, los pies y la nariz presentan aumento de temperatura, enrojecimiento (eritema) e hinchazón (edema). Estos síntomas pueden persistir durante días, semanas, y en algún caso, durante varios meses, siendo necesario, en los casos más graves, el uso de morfina para mitigar los dolores.

**Toxinas:** Ácidos acromélicos A-E (Fig. 9), de estructura química muy similar a la de los ácidos kainico y domoico. Son aminoácidos hidrosolubles y termoestables que se han identificados en ambas especies de *Clitocybe*, *C. acromelalga*, *C. amoenolens* (3, 4, 76).

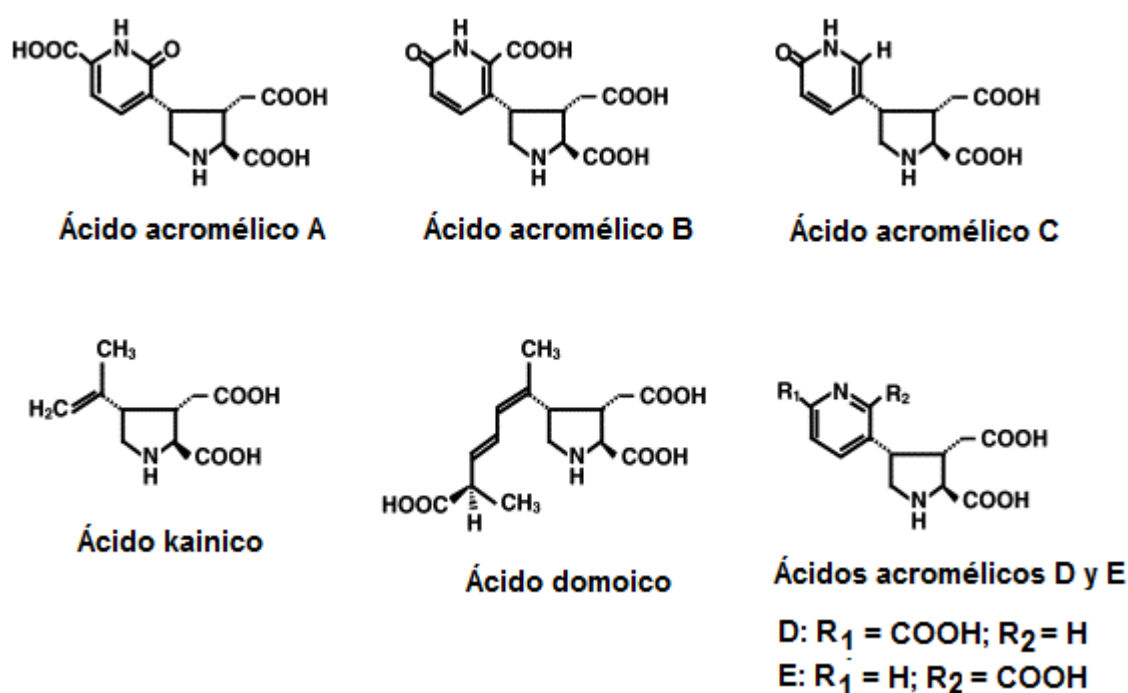
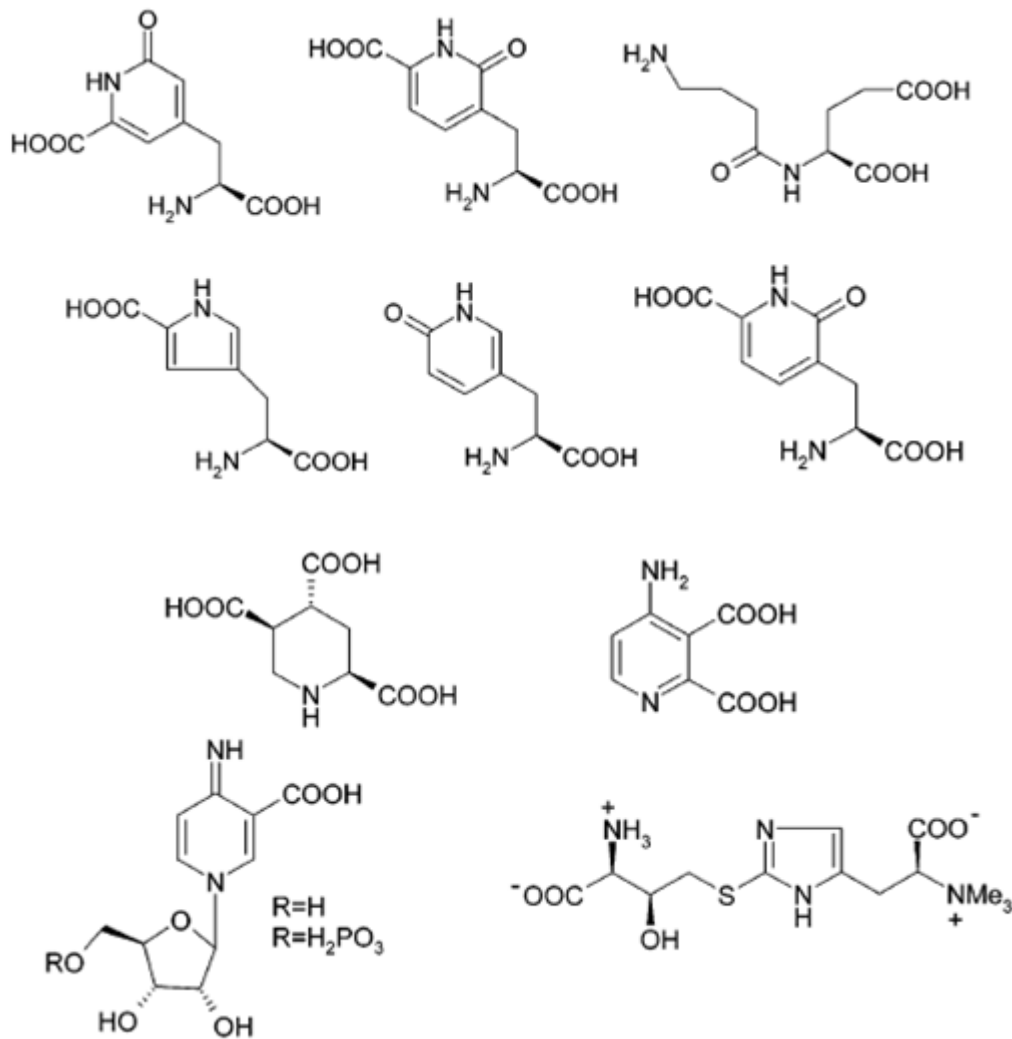


Figura 9: Estructuras químicas de los ácidos acromélicos A-E.

Otros aminoácidos no proteicos aislados de *Clitocybe acromelalga* se muestran en la Fig. 10(5).



**Figura 10: Estructuras químicas de aminoácidos no proteicos aislados de *Clitocybe acromelalga*.**

3. **Mecanismo de acción:** Los ácidos acromélicos son agonistas potentes de los receptores del glutamato. El mecanismo de acción de estas sustancias radicaría en un trastorno del metabolismo del triptofano que lesionaría fibras del sistema nervioso autónomo (76).

**Especies causantes del micetismo:** División: Basidiomycota; Clase: Agaricomycetes; Orden: Agaricales; Familia: *Tricholomataceae*; *Clitocybe acromelalga*; *Clitocybe amoenolens*; *Clitocybe gibba*; Orden: Boletales; Familia: *Hygrophoropsidaceae*; *Hygrophoropsis aurantiaca* (76).

**Toxíndrome giromitrínico o neurotóxico epileptogénico. Micetismo por giromitrina:**

Las especies relacionadas con este micetismo son las llamadas “falsas morillas”, ascomicetos de la familia *Helvellaceae*, y generalmente se encuentran en coníferas, álamos y, a veces, en bancos de nieve que se están derritiendo. La especie más comúnmente asociada con la intoxicación y estudiada con mayor detalle es *Gyromitra esculenta*, pero las toxinas se han encontrado en otras especies de *Helvellaceae* (88). También el consumo de grandes cantidades en una sola comida o en días sucesivos de la “falsa morilla” *Verpa bohemica* (Familia: *Morchellaceae*) que es una especie comestible del norte de América del



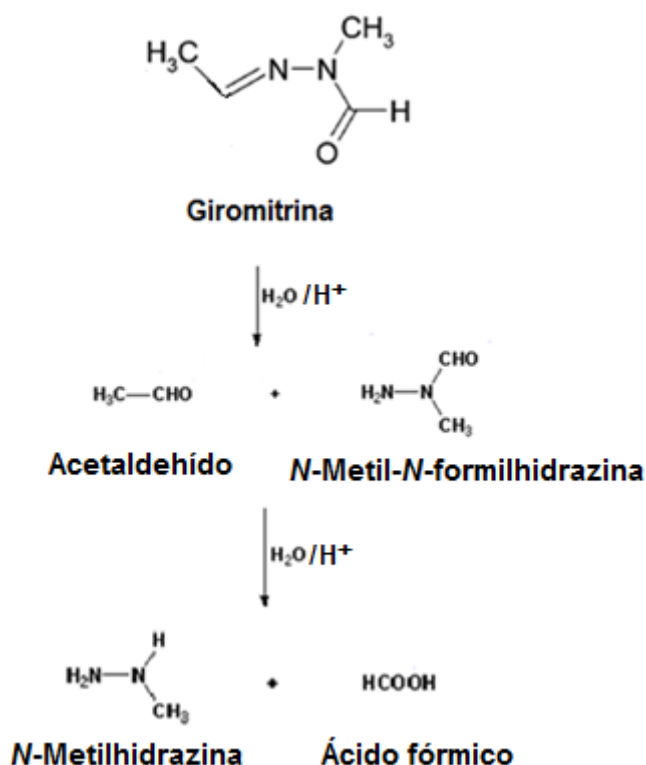
Norte, Europa y Asia, causa intoxicaciones en personas susceptibles (88). Asimismo, la intoxicación por algunas especies de *Helvella*, *Verpa*, *Peziza*, *Disciotis* y *Sarcosphaera* se asemeja mucho al síndrome causado por *Gyromitra esculenta*, por lo que se ha especulado que estos hongos tendrían las mismas toxinas, aunque aún no se ha confirmado.

Las morillas verdaderas, comestibles, que se comercializan han sido a veces mezcladas inadvertidamente por los recolectores con *Gyromitra esculenta* y *Verpa bohemica*, produciendo así intoxicaciones, según lo registrara la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA: *Food and Drug Administration*) (89).

**Período de latencia:** La incubación dura de seis a doce horas, a veces cuatro a doce horas, raramente menor de dos horas.

**Síntomatología:** Los primeros trastornos se presentan con dolor de cabeza, malestar gastrointestinal, náuseas, diarreas y vómitos, seguidos de deshidratación, hipotensión y alteraciones del ritmo cardíaco. Los efectos gastrointestinales pueden durar hasta 2 días en humanos. Los temblores, la debilidad y la ataxia también pueden aparecer en los primeros 2 días. En casos graves, aunque raros, pueden aparecer ictericia, metahemoglobinemia, hemólisis, convulsiones y coma (incluido coma hepático) varios días después de la exposición (88, 90). En raras oportunidades, la hemólisis puede dar lugar a rhabdomiólisis y a alteración de la función renal. Las características más típicas son las alteraciones del sistema nervioso central y el nivel de glucemia. En la intoxicación severa, ocurre una segunda fase hepatorenal después de un período sin síntomas. Estos casos pueden ser fatales (91). En casos graves hay trastornos nerviosos, así como alteración hepática y del bazo. Es posible la muerte a los dos o cuatro días de la intoxicación debido a insuficiencia circulatoria o paro respiratorio (92). Es decir que se trata de una afección cardiocirculatoria, neurológica, hepática y renal, produciéndose en algunos casos hemólisis. Al igual que con todos los micetismos, la identificación del material fúngico, por parte de un micólogo experimentado, es fundamental para llegar a un diagnóstico. En las unidades sanitarias, el diagnóstico se basa principalmente en la identificación de los hongos y en los signos clínicos y anomalías de laboratorio.

**Toxinas: Giromitrina** (acetaldehído *N*-metil *N*-formilhidrazona) (Fig. 11), el compuesto que se encuentra en estos hongos, “falsas morillas”, es un irritante directo del tracto gastrointestinal. Algunas especies del género *Gyromitra* no son tóxicas, mientras que otras, como la ampliamente distribuida *G. esculenta*, contienen niveles tóxicos de giromitrina (40-700 mg/kg materia fresca) y varios compuestos menores relacionados químicamente (91). La concentración de giromitrina varía según la especie, localidad y estación, lo que lleva a una variación considerable en el grado de intoxicación (88). En los seres humanos, parece haber una gran variabilidad individual con respecto a la toxicidad de las falsas morillas. En ratones, las DL<sub>50</sub> orales de **giromitrina**, ***N*-metil-*N*-formilhidrazina** y **monometilhidrazina** (o *N*-metilhidrazina) (Fig. 11) son 344, 118 y 33 mg/kg respectivamente (93). En humanos, la dosis letal estimada de giromitrina es 20-50 mg/kg para adultos y 10-30 mg/kg para niños. No se ha establecido la toxicidad para perros o gatos (88).



**Figura 11: Hidrólisis ácida de giromitrina dando *N*-metil-*N*-formilhidrazina y *N*-metilhidrazina.**

**Mecanismo de acción de las toxinas:** Giromitrina (*N*-metil-*N*-formilhidrazona de acetaldehído) es la toxina más abundante presente en el hongo silvestre *Gyromitra esculenta*, en el que se identificaron nueve *N*-metil-*N*-formilhidrazonas volátiles (94). Una vez ingeridos los hongos, la giromitrina se hidroliza rápidamente en las condiciones ácidas del estómago, formando hidrazinas cancerígenas y tóxicas de fácil absorción, como ***N*-metil-formilhidrazina**, que a su vez se metaboliza a ***N*-metilhidrazina** (Fig. 11). Cuando las hidrazinas alcanzan el hígado, se metabolizan adicionalmente a especies reactivas, como cationes metilo y radicales metilo. **Esta conversión de giromitrina en *N*-metilhidrazina a pH ácido se ha demostrado en el estómago del ratón después de la administración oral de giromitrina (94).** El grado de hidrólisis depende del pH en el estómago, pero no es completa (93). La respuesta individual a giromitrina es variable. Estas toxinas son termolábiles, volátiles y solubles en agua (90). Por lo tanto, las intoxicaciones pueden ocurrir no sólo por ingerir los hongos, sino también al inhalar los vapores al cocinarlos. También se observaron efectos tóxicos típicos en personas que manipulan con frecuencia hongos que contienen giromitrina (88). También influye la cantidad que se consume; el consumo sucesivo de pequeñas cantidades de carpóforos que contengan giromitrina e hidrazinas llega a ser tóxico, debido a que las dosis son acumulativas. A su vez, las personas que comen sólo algunos hongos cocidos pueden ingerir cantidades suficientemente desintoxicadas para no tener síntomas. Esto ha causado malentendidos entre las personas sobre la posible letalidad de estos hongos. Los síntomas aparecen si los carpóforos son consumidos poco cocidos, con el agua de cocción, o en estado fresco (puede ser mortal si se consume sin

desechar). Los animales generalmente comen carpóforos crudos; por lo tanto, cualquier exposición a estos hongos puede ocasionarles morbilidad y mortalidad graves (88).

Si se desean comer estos hongos, se recomienda hervirlos con grandes cantidades de agua (descartando el agua antes del consumo) (95), secando las muestras antes de comer (96) o, si se comen por primera vez, restringir el consumo a porciones pequeñas para probar su tolerancia. El contenido de giromitrina se reduce por el secado prolongado al aire o por la cocción de carpóforos frescos y secos. Sin embargo, sólo se remueven moléculas libres de giromitrina durante el secado; para aquellas que están unidas orgánicamente, queda aproximadamente la mitad del contenido de toxina. Es por eso que se dice que el proceso de ebullición y secado disminuye, pero no elimina por completo a las toxinas. La ebullición debe repetirse varias veces en grandes volúmenes de agua en un recipiente abierto para permitir la evaporación de las hidrazinas volátiles. Si se cocina en una olla cerrada, las sustancias tóxicas se conservarán (91).

**Análisis de girometrina y metilhidrazina:** Se desarrolló un método para determinar el contenido total de hidrazonas basado en la hidrólisis ácida de giromitrina y otras hidrazonas relacionadas en carpóforos de *Gyromitra esculenta* secados al aire; con derivatización de *N*-metilhidrazina con cloruro de pentafluorobenzoílo (97). El derivado, *tris*-pentafluorobenzoílmethylhidrazina (*tris*-PFB-MH) se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-EM). La precisión del método resultó mejor que 10% (desviación estándar relativa) para 0,5 ng/μL de *N*-metilhidrazina en solución. La concentración mínima detectable de *N*-metilhidrazina (*tris*-PFB-MH) por este método resultó ser de aproximadamente 12 pg/μL, que es igual a 0,3 μg/g de materia seca del hongo. El método sirve como monitor del contenido de la toxina giromitrina.

4. **Toxicodinamia:** Giromitrina se considera un irritante gastrointestinal que conduce a signos clínicos de vómitos, dolor abdominal y diarrea 6-12 h después de la ingestión del hongo tóxico (98). La principal toxina responsable de las convulsiones que se observan en los casos graves de envenenamiento por *Gyromitra* es *N*-metilhidrazina. La *N*-metilhidrazina es en parte responsable de los signos neurológicos, ya que inhibe a la piridoxal-fosfoquinasa, dando como resultado una disminución de las concentraciones de piridoxal-5-fosfato, con la subsiguiente disminución de la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y un aumento en las concentraciones de ácido glutámico, aumentando así la susceptibilidad a las convulsiones. En un estudio en ratones, se evidenció que las concentraciones de GABA en el cerebro no disminuyeron significativamente en respuesta a las cantidades tóxicas de *N*-metilhidrazina (99). Por lo tanto, los efectos tóxicos de giromitrina no son sólo atribuibles a *N*-metilhidrazina. Además de la irritación gastrointestinal y la neurotoxicidad, se han descrito fallas hepáticas y renales, así como hemólisis. En estudios en animales se demostró que *N*-metil-*N*-formilhidrazina, otro metabolito de giromitrina, produce la depleción de citocromo P<sub>450</sub> dentro de las 8-12 horas posteriores a la administración de giromitrina (99), mientras que *N*-metilhidrazina no presenta efectos hepatotóxicos similares. Los compuestos de hidrazina muestran efectos irritantes en las membranas de las mucosas y también en el tracto gastrointestinal. Además, todas estas hidrazinas presentes en las morillas falsas, como *N*-metilhidrazina, son muy tóxicas para humanos y animales, con capacidad hemolítica y cancerígena (100). Se observaron anorexia, inflamación del pulmón y del hígado, pérdida de peso y nefritis intersticial después de la inhalación de compuestos de hidrazina en experimentos con animales (101). Además, los compuestos de hidrazina son responsables del agotamiento del

glutación en los eritrocitos y de la destrucción de macromoléculas en el hígado, posiblemente mediante el desarrollo de radicales metilo (101). En un informe de un caso veterinario, se muestran los efectos del consumo de estos hongos crudos; un perro de 10 semanas vomitó 2-3 horas después de masticar un hongo identificado posteriormente como *G. esculenta*; 6 horas después de la ingestión, el perro estaba letárgico, se volvió comatoso y murió 30 minutos después. Los hallazgos histopatológicos incluyeron tubulonefrosis renal, degeneración hepática periáscinar y eritrofagocitosis (88).

**Especies causantes del micetismo:** División: Ascomycota; Clase: Ascomycetes; Orden: Pezizales; Familia: *Helvellaceae*: *Gyromitra esculenta*; *Gyromitra fastigiata*; *Gyromitra gigas*; *Gyromitra infula* (102). Familia: *Helvellaceae*: *Helvella crispa*; *Helvella elastica*; *Helvella lacunosa*; *Helvella macropus*; Familia: *Morchellaceae*: *Verpa bohemica*. División: Ascomycota; Clase: Leotiomycetes; Orden: Leotiales; Familia: *Leotiaceae*: *Leotia lubrica*. División: Ascomycota; Clase: Leotiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: *Cudoniaceae*: *Cudonia circinans*; *Spathularia flavida*. División: Ascomycota; Clase: Pezizomycetes; Orden: Pezizales; Familia: *Pezizaceae*: *Peziza badia* (88).

**Toxíndrome cerebeloso o micetismo por *Morchella* spp.:**

Las especies del género *Morchella* o *Morchella* spp. (“morillas verdaderas”; “hongo de ciprés”; “múrgoles”; “colmenillas”) son hongos ascomicetos medicinales y comestibles, muy apreciadas por los gourmets franceses, españoles y argentinos en la Patagonia andina, caracterizados por poseer ascocarpos de aspecto reticulado. Debido a su alto valor económico y científico, el género *Morchella* Dill. ex Pers: Fr. se ha convertido en un tema de investigación clave, por su taxonomía, diversidad y distribución de especies, diversidad ecológica, filogenia y biogeografía, cultivo artificial y genoma (103).

Se han informado varios casos de intoxicación por morillas, con síntomas gastrointestinales y neurológicos, con síndrome inebrante (tipo embriaguez) en algunos casos. Se debe tener precaución con los carpóforos pertenecientes a los *Ascomycetes*, pues suelen contener sustancias tóxicas de las que apenas se conocen sus efectos en el organismo humano.

**Período de latencia:** Entre 5-20 horas. Lo común es que a las 5-6 horas después de la ingestión se manifiesten los síntomas gastrointestinales y a las 10-12 horas el síndrome neurológico (104).

**Síntomatología:** Es una intoxicación leve y pasajera, pero que incapacita al intoxicado de manera alarmante. Los primeros síntomas son gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal). Ocasionalmente, estos síntomas gastrointestinales se asocian con urticaria o picazón. Luego siguen los síntomas neurológicos con síndrome inebrante. Los síntomas pueden incluir hipotonía muscular, alteración del equilibrio, apareciendo una marcha característica (ataxia cerebelosa o marcha de ebrio), dismetría, habla escandida (pronunciación involuntaria de las palabras en las sílabas que las componen, alterando el habla), disdiadocoquinesia (incapacidad para realizar movimientos alternantes rápidos con las manos; por ejemplo: dificultad para abrocharse los botones), temblor intencional por falta de cálculo de la fuerza y la distancia que hay que ejercer para los diferentes movimientos. Una variedad de otros efectos que se observaron ocasionalmente, como parestesias y disartria (dificultad para hablar), con marcados efectos inebrantes. Estos signos indican problemas en el cerebelo, y se acompañan de náuseas y vómitos bruscos.

Ya en 1889 Roumequère informó intoxicaciones con morillas (104). Posteriormente hubo otros registros sobre el tema, todos los cuales adolecen de falta de datos importantes, como la identificación de los hongos consumidos, las condiciones de cocción y las cantidades

consumidas (10, 104).

Se hicieron conocer seis casos de personas que desarrollaron efectos cerebelosos 6-12 horas después del consumo de morillas comestibles (*Morchella conica* var. *deliciosa* y *Morchella esculenta*) en Oberbayern, Alemania (105). Los síntomas fueron autolimitados y desaparecieron después de un día. Todos trajeron las muestras de los hongos que habían consumido, que se identificaron macroscópicamente y por identificación microscópica de las esporas. En todos los casos, las pruebas de laboratorio de rutina fueron normales.

Unos ingresaron con marcha atáxica, pupilas mióticas y un temblor fino. Otros además con ataxia de tronco y miembros que les impedía escribir, y adiadoquinesia (falta de coordinación de los movimientos corporales; signo clínico que se relaciona con el cerebelo, que es el centro de coordinación del cerebro). Algunos con náuseas además de los síntomas mencionados. Todos los síntomas se resolvieron completamente dentro de un día.

El centro de control de intoxicaciones reportó otros 10 casos similares, dos de ellos desarrollaron mareos, marcha atáctica y visión borrosa (105). *Gyromitra esculenta*, que causa efectos neurotóxicos, posiblemente se podría confundir con las morillas comestibles, pero *Gyromitra* no crece en esa región, crece en otra época, predominantemente a fines del verano/otoño, tiene otro fenotipo y además es un hongo hepatotóxico. Los casos descriptos no mostraron signos de hepatotoxicidad. En la literatura micológica, se han informado anteriormente casos esporádicos con síntomas neurológicos (106): seis personas en una familia de siete miembros tenían mareos y efectos inebrantes después de una comida de 3 kg de *Morchella esculenta*; una persona permaneció asintomática, aunque las comió por segunda vez al día siguiente. Nothnagel (106) cita a Jaccodet, quien en 1930 informó que *Morchella conica* causaba una especie de embriaguez leve. Varias intoxicaciones con morillas con síndrome neurológico se han registrado en centros de control de intoxicaciones en América del Norte (107) y en Francia (104). Se hizo un estudio retrospectivo de 20 años de intoxicaciones con morillas registradas en Centros Franceses de Control de Intoxicaciones describiendo una serie de casos bien documentados con efectos neurológicos después de su consumo (104). Los casos se clasificaron como síndrome neurológico (temblor o mareo/efecto inebrante o inestabilidad/ataxia, a veces asociados con síntomas gastrointestinales) o síndrome gastrointestinal aislado (náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal). Ocasionalmente, los síntomas gastrointestinales se asociaron con urticaria o picazón (104). Los resultados mostraron que 146 pacientes presentaron síndrome gastrointestinal 5 horas tras la ingesta, y 129 presentaron síndrome neurológico 12 horas después del consumo de morillas. Los pacientes con síndrome neurológico experimentaron más comúnmente temblor (53%), mareos/efecto inebrante (53%) o inestabilidad/ataxia (21%), con o sin síntomas gastrointestinales. Los síntomas gastrointestinales (67%) y otros síntomas neurológicos también estuvieron simultáneamente presentes (principalmente trastornos oculares/de visión: 26%, parestesias: 7%, somnolencia/confusión: 6% y trastornos musculares: 6%). Los problemas visuales generalmente fueron diplopía o visión borrosa. Estos pacientes ingirieron con mayor frecuencia una gran cantidad de morillas (104).

Dentro de las 24 horas, el 90% de los pacientes se habían recuperado, los síntomas desaparecieron sin dejar secuelas(9, 104). Cuando se dispuso de información detallada, el síndrome neurológico aparentemente sólo se observó después de la ingesta de grandes cantidades de morillas (más de 100 g por comida), aún si estaban bien cocidas o secas. Intoxicaciones con síntomas principalmente gastrointestinales generalmente se observaron después de la ingesta de morillas crudas o insuficientemente cocidas, aún después de

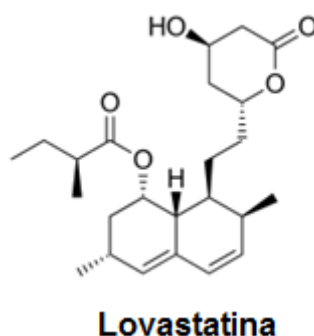
ingerir pequeñas cantidades (104, 107). Los compuestos tóxicos responsables de los efectos gastrointestinales sin síntomas neurológicos se destruyen o se eliminan al menos parcialmente con la cocción (108). En base a la información disponible, se anticipa que el consumo de morillas secas no da lugar a intoxicaciones (108), pero no siempre es el caso (104, 107). Todos los síntomas siempre se resuelven en un día (10).

Debe tenerse en cuenta que la morilla es un hongo costoso, que por lo general sólo se consume en pequeñas cantidades. La ingesta es inferior a 50 g de cantidad fresca o menor de hongos secos por comida, pero ocasionalmente puede consumirse en grandes cantidades (alrededor de 200-600 g por comida (105) o como "Varios platos sucesivos o comidas" (104).

La intoxicación por morillas suele ser controvertida pues algunos comensales pueden no tener síntomas, como el caso indicado recientemente (109). Una explicación puede ser que la neurotoxina supuesta sea volátil o inestable o bien que las cantidades presentes en las morillas varíen según las regiones. En los casos de intoxicación, los carpóforos pueden haberse cocinado durante un tiempo demasiado breve para eliminar todo el tóxico y que se hayan consumido grandes cantidades de morillas (105). Se podría agregar que los consumidores pueden presentar sensibilidad variable hacia los compuestos tóxicos de las morillas.

**Toxinas:** Las verdaderas morillas o *Morchella* spp. contienen **hemolisinas tóxicas** termolábiles (un tipo de proteínas que producen hemólisis; rompen las membranas celulares de eritrocitos, leucocitos y plaquetas). Se dice que las morillas son inofensivas al cocinarlas, ya que las hemolisinas que contienen se alteran o descomponen por acción del calor (~60-80°C) (110) y también se destruyen por desecación. Por lo tanto, estos hongos no se pueden consumir crudos. Más aún, se recomienda combinar el secado y la cocción, así que si son frescos, primero deben secarse, después rehidratarse (desechando el agua) y a continuación cocinarse unos 30 minutos a una temperatura entre 70 y 90° C.

En estudios con micelios de Morilla se han identificado pequeñas cantidades del aminoácido no proteico **ergotioneína**, 19 mg/kg (peso seco, media de 3 muestras) (111) y hasta 35 mg/kg (peso seco, media de 3 muestras) (112). También se han encontrado pequeñas cantidades de **lovastatina** (Fig. 12), 8-21 mg/kg (peso seco) en los micelios (112), mientras que Lo *et al.* (111) identificaron 1440 mg/kg (peso seco, promedio de 3 muestras) de lovastatina. No se sabe si estos compuestos bioactivos también se encuentran en los carpóforos de morillas.

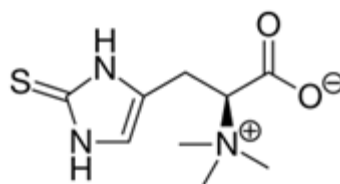


**Figura 12: Estructura química de lovastatina.**

Las estatinas naturales son derivados de hexahidronaftaleno, sustituido con una  $\beta$ -hidroxilactona. Lovastatina es una estatina que se usa como un fármaco contra la hipercolesterolemia para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular. Lovastatina es un



compuesto de origen natural que se encuentra en hongos como *Pleurotus* spp., entre ellos, *Pleurotus ostreatus* (113). Parece que algunos cultivares de este hongo no producen lovastatina, mientras que otros producen cantidades bastante altas. En ciertos casos, las estatinas pueden dar lugar a miopatía, caracterizada por debilidad y/o dolor muscular y, en casos muy raros, rabdomiólisis (114, 115). Estos efectos adversos graves no se informaron después del consumo de *P. ostreatus*. Por lo general, lovastatina se tolera bien, si bien presenta efectos secundarios, como: aumento de la creatinfosfoquinasa sérica, de las transaminasas séricas, de la fosfatasa alcalina, trastornos gastrointestinales (estreñimiento, flatulencia, dolor abdominal, dispepsia, diarrea, náuseas, vómitos), trastornos musculoesqueléticos (miopatía, mialgia, calambres musculares), trastornos hematológicos (debilidad, anemia), trastornos de la piel y tejido subcutáneo (erupción cutánea, prurito), trastornos del sistema nervioso (cefalea, parestesia, mareos, neuropatía periférica, visión borrosa) (116). La lactona lovastatina durante los procesos de cocción puede hidrolizarse dando el correspondiente ácido hidroxicarboxílico, la forma activa que disminuye el colesterol. Lovastatina (Fig. 12) es estable en soluciones acuosas neutras o ácidas a temperatura ambiente, pero el 25% se hidroliza después de una hora de calentamiento a 100°C. En un estudio térmico y cinético sobre estatinas, se demostró que la lovastatina era estable hasta 190°C en condiciones libres de solventes (117). En conjunto, es probable que una proporción considerable de lovastatina en el hongo sea estable durante la cocción o posiblemente se hidrolice en cierta medida al ácido hidroxicarboxílico, que es la forma biológicamente activa.



**Ergotioneína**

**Figura 13: Estructura química de ergotioneína.**

Ergotioneína es un aminoácido natural derivado de histidina que contiene un átomo de azufre en el anillo imidazólico. Esta sustancia es biosintetizada por micobacterias, cianobacterias y hongos filamentosos, así como muchos hongos comestibles, como: carpóforos de *Lepista nuda*, carpóforos secos de especies comestibles de *Pleurotus*, “Shiitake” (*Lentinula edodes*) y hongos botón (*Agaricus bisporus*) (111, 112). En general, ergotioneína (Fig. 13) se ha encontrado en cantidades algo menores en otros hongos comestibles (111, 112). Considerando que el procesamiento de alimentos destruye algunos componentes bioactivos, una proporción considerable de la ergotioneína permanece sin cambios (118). Se ha demostrado en numerosos estudios *in vitro* y algunos *in vivo* que ergotioneína tiene propiedades antioxidantes y citoprotectoras en los hongos frente a una amplia gama de factores estresantes celulares (119) y puede participar en el transporte de iones metálicos y en la regulación de las metaloenzimas. Aunque no puede ser sintetizada por las células humanas, ergotioneína (Fig. 13) es absorbida a través de la dieta y se acumula en tejidos específicos a través del transportador de ergotioneína altamente específico, ETT (del inglés *ergothioneine transporter*), también conocido como OCTN1 (símbolo del gen: *SLC22A4*), para entrar en las células (119, 120). La expresión de ETT se



ha confirmado en líneas celulares humanas y de animales y su transporte funcional de ergotioneína se ha observado en estudios preliminares *in vivo* (121). En los humanos, ergotioneína se adquiere exclusivamente a través de la dieta y se acumula en eritrocitos, médula ósea, hígado, riñones, líquido seminal y ojos (120) y también está presente en la piel (119). Sin embargo, el rol fisiológico de ergotioneína no está determinado y la consecuencia de la deficiencia de ergotioneína no está clara (120). El transportador de ergotioneína ha sido sugerido como un posible factor en las enfermedades autoinmunes artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, y los pacientes con artritis reumatoide tienen altos niveles de ergotioneína (120). No se han relacionado efectos adversos ni siquiera con una ingesta elevada del compuesto. El Panel sobre Productos Dietéticos para la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria considera que los límites diarios seguros de 2,82 mg/kg de peso corporal para infantes, 3,39 mg/kg para niños pequeños y 1,31 mg/kg para adultos, incluidas mujeres embarazadas y en lactancia (122).

**Mecanismo de acción:** No se conoce el mecanismo de acción de las posibles hemolisinas tóxicas, ni si existen otras toxinas que contribuyan al cuadro sintomatológico. Se debería verificar si lovastatina es activa en la intoxicación. El cerebelo es una parte del sistema nervioso que participa activamente en el tono muscular, el equilibrio, la fuerza y la trayectoria de los movimientos, así como en el habla. Sin que la intoxicación afecte a órganos vitales, el cuadro producido por estos hongos puede ser bastante invalidante.

**Análisis filogenéticos moleculares del género *Morchella*:** El género *Morchella* pertenece a la familia *Morchellaceae* (Orden: Pezizales). Se han encontrado representantes de esta familia en Europa (123), en Asia (123, 124), Medio Oriente (125), Australia (126), en América del Norte y Centro América [Canadá (127), Estados Unidos (127), Méjico, Costa Rica y Guatemala (128)] y América del Sur [Perú (128), Venezuela (128), Colombia (128), Argentina (129), Chile (129) y Brasil (130)].

La identificación de las especies del género *Morchella* es muy problemática debido a la considerable diversidad morfológica intraespecífica y a la carencia de caracteres diagnósticos. Más aún, la identificación basada en fenotipos a nivel de especie sigue siendo inadecuada debido a sus ciclos de vida complejos, a las diferencias menores y a la plasticidad de las características morfológicas entre las especies (103, 131), siendo microscópicamente similares (125). Además, existe falta de acuerdo entre los nombres científicos y comunes. Es por eso que se han realizado estudios moleculares. El nivel de especie es ampliamente discutido, dado el alto polimorfismo. Así, autores franceses estudiaron el polimorfismo del ADN en *M. esculenta* y *M. conica* determinando las secuencias completas del espaciador transcrito interno (ITS: *internal transcribed spacer*) de los genes que codifican ARNr en ambas especies para dilucidar la discrepancia de longitud del ITS entre ambas especies. También determinaron la diversidad de ITS de ADNr en las morillas (132). El ARN ribosómico 28S (ARNr 28S) es el principal ARNr ribozima con actividad de peptidil-transferasa que permite la formación de enlaces peptídicos entre dos aminoácidos durante la proteogénesis. Los genes que codifican este ARNr 28S se denominan "*ADNr 28S*". La comparación de las secuencias de estos genes se usa a veces en análisis molecular para construir árboles filogenéticos de algunas especies, por ejemplo, en hongos. Se efectuó la resolución filogenética de *Morchella*, *Verpa* y *Disciotis* (géneros presentes en la familia *Morchellaceae* (133) en base al análisis de enzimas de restricción del gen *ADNr 28S*. En algunos casos, se observó una mayor variación genética intraespecífica que entre las especies putativas. Los avances de los últimos años en estudios

filogenéticos han contribuido al conocimiento taxonómico y de las relaciones biogeográficas del género *Morchella* (124, 127, 131, 133). Así, estos estudios filogenéticos del género *Morchella* (103, 134) demuestran la existencia de 67 especies, que se organizan en los clados *Esculenta*, *Elata* y *Rufobrunnea* (133).

**Hace unos pocos años (131) se hizo una revisión de la nomenclatura de especies del género *Morchella*** de Europa y América del Norte en base a análisis filogenéticos moleculares. Se establecieron así relaciones evolutivas inferidas a partir de datos de multilocus y una taxonomía unificada. Los resultados revelaron que el número de especies de *Morchella* en Europa (n = 21) es casi idéntico al de América del Norte (n = 22), pero sólo se encontraron siete especies en ambos continentes. Esto está de acuerdo con los informes previos de alto endemismo continental dentro del género. Como contribución a la taxonomía, se identificó un nuevo subclado que incluye holotipos de *M. castanea* y *M. brunneorosea* en la sección *Morchella* (Clado *Esculenta*). Los lectotipos para *Morchella deliciosa*, *M. eximia* y *M. tridentina* se designaron en este trabajo, así como los epitipos para *M. dunalii*, *M. eximia*, *M. purpurascens* y *M. vulgaris*. Se determinó que *Morchella conica* es ilegítima, y se requiere más investigación para determinar la identidad de *M. elata* y *M. inamoena* (131).

En la Patagonia Argentina, las morillas están asociadas con bosques nativos de *Austrocedrus chilensis* ("ciprés de la Cordillera") y *Nothofagus antarctica* ("ñire") y varias coníferas exóticas que fueron introducidas desde el oeste de América del Norte. Pildain *et al.* (135) han contribuido al conocimiento de su taxonomía y sus relaciones filogenéticas con otras especies del género. Las secuencias de ADN se obtuvieron de la región ITS del ADNr (ITS1, 5.8S e ITS2) y se utilizaron en análisis filogenéticos. Se llevó a cabo la identificación de colecciones de *Morchella* de la Patagonia y sus relaciones filogenéticas con otras especies del hemisferio norte. La comparación se realizó mediante el análisis de secuencias de ADN obtenidas de cuatro loci (135). Los análisis de conjuntos de datos individuales y combinados revelaron que las morillas Patagónicas pertenecen al Clado *Elata* ("Morillas negras") y comprenden tres linajes a nivel de especie fuertemente sustentados tanto del bosque nativo Patagónico como de árboles exóticos introducidos desde el oeste de América del Norte. Un linaje se identificó como especie filogenética *Morchella frustrata* (*Mel-2*), que se conoce de EE. UU. y Canadá. El segundo linaje, que parecía ser "adaptado al fuego", se identificó como la especie filogenética *Morchella septimelata* (*Mel-7*), que también se conoce en Estados Unidos. Esta especie fue recolectada de bosques nativos quemados, compuestos principalmente de *A. chilensis* y *N. antarctica*, pero también de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Blanco, que es nativa del oeste de América del Norte. Los análisis filogenéticos sugirieron que la tercera especie de la Patagonia estaba anidada dentro del Subclado *Elata*, rico en especies, y representa un nuevo linaje a nivel de especie (designado informalmente *Mel-37*) dentro del Clado *Elata*. Las colecciones actuales de la Patagonia constituyen la latitud más meridional, en la cual se haya informado *Morchella* hasta la fecha. La identificación de dos morillas de Argentina como taxones norteamericanos es, por lo tanto, un patrón biogeográfico notable. En vista de la hipótesis de que el Clado *Elata* se originó en el oeste de América del Norte, los autores especularon que al menos dos de los linajes colonizaron América del Sur desde América del Norte a través de la dispersión a larga distancia, migración o, más probablemente, fueron introducidos con especies de árboles exóticos (135).

**Especies causantes del micetismo:** Varias especies del género *Morchella*. División: *vulgaris*; *Morchella conica* Pers. (*M. elata* Fr.) ("morilla negra") y *Morchella esculenta*(L.) Pers.

(“morilla”) son morillas comestibles. Estas dos últimas especies, según estudios moleculares se pueden dividir en varias especies más, que no se pueden distinguir morfológicamente (133). Anteriormente, Es por eso que se han abordado estudio genéticos.

*Morchella esculenta* crece en Argentina, en la Patagonia, en la zona andina, al oeste de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut; también en el sur de Chile. Esta especie es denominada “hongo del ciprés” porque crece debajo del ciprés, un árbol autóctono de la Patagonia Andina Argentina. Estos hongos se cosechan una vez al año, en los meses de setiembre y octubre, por lo cual se comercializan generalmente deshidratados. Se consumen en la zona y se exportan. Tienen delicado y exquisito sabor, con un muy buen aroma.

### **3.6.Toxíndrome encefalopático o neurotóxico tardío. Micetismo por *Hapalopilus rutilans* (= *H. nidulans*):**

Se observaron casos que afectaron al SNC por ingestión de dos especies diferentes de carpóforos: *Hapalopilus rutilans* en Alemania y *Pleurocybella porrigens* en Japón (76), con diferencias en el tiempo de latencia que es muy corto en el último caso.

*Hapalopilus rutilans* (también conocido como *H. nidulans*) es una especie de hongo políporo de la familia *Polyporaceae*, que se encuentra ampliamente distribuida en los cinco continentes. Crece en la madera muerta, caída o en pie, de árboles de hoja caduca, en la que fructifica sólo, en grupos, fusionados o superpuestos. Los carpóforos de *H. rutilans* son neurotóxicos si se ingieren, según los casos registrados en Alemania de un adulto y dos niños, en 1986 (76, 136) y dos casos en 2013 con síntomas similares y recuperación, debido a la ingestión del hongo por confundirlo con *Fistulina hepatica* comestible (137). El conjunto de síntomas derivados del consumo de *H. rutilans* se ha denominado síndrome neurotóxico tardío (138).

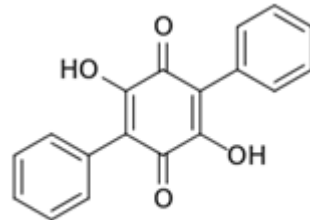
**Período de latencia:** La una incubación es de unas 12 horas después de la ingestión del hongo (76).

**Sintomatología:** Los primeros síntomas corresponden a trastornos gastrointestinales con náuseas y repetidos vómitos acompañados de dolor abdominal. Varias horas más tarde, aparecen trastornos hepatorenales (leve aumento de alanina-aminotransferasa y creatinina sérica) y síntomas neurológicos centrales (vértigo, ataxia, somnolencia, discapacidad visual). Los síntomas disminuyen en unos pocos días. En el caso que mencionáramos de intoxicación en Alemania de un hombre y dos niños intoxicados se observaron los síntomas indicados. Se registró actividad lábil en el electroencefalograma, así como signos difusos inespecíficos y signos compatibles con edema cerebral. Estos resultados se obtuvieron aún después de 3 semanas. El crecimiento de los niños no pareció afectarse. Además, la orina del adulto y de los dos niños intoxicados se volvió púrpura-violeta temporariamente. Por lo tanto, la coloración púrpura de la orina después de la ingestión de un hongo polipórico es muy sugerente de intoxicación por *H.rutilans* (76).

Se recuperaron completamente una semana después (136). En dos casos más recientes (137), un padre y su hija de 13 años recolectaron carpóforos identificados como los del hongo comestible *Fistulina hepatica* y comieron una cantidad desconocida. A las 12 horas después de la ingestión, ambos sujetos se quejaron de dolor abdominal, luego náuseas, vómitos, anorexia, astenia, diplopía y visión borrosa. El padre también tuvo alucinaciones visuales. A los 2 días después de la ingestión, el examen clínico mostró nistagmo multidireccional. El padre también tuvo trastornos de equilibrio y ambos intoxicados emitieron orina púrpura. Las pruebas de laboratorio mostraron niveles elevados de creatinina sérica y urea en sangre, proteinuria y leucocituria en ambos pacientes y aumento leve de las enzimas

hepáticas en el padre. El color de la orina volvió a la normalidad a los 2 días y a los 7 días después de la ingestión en la niña y su padre respectivamente. La recuperación clínica y bioquímica completa se obtuvo dentro de una semana en ambos casos (137). Los signos y síntomas resultaron similares a los reportados previamente.

**Toxina:** La toxina es el **ácido polipórico**(2,5-difenil-3,6-dihidroxi-1,4-benzoquinona) (Fig. 14), que es un compuesto de *p*-terfenilo de benzoquinona, identificado y designado por primera vez a partir de un cultivo micelial de esta especie en 1877 (139). Su estructura fue dilucidada en 1926 y confirmada por cristalografía en 2001 (140).



**Ácido polipórico**

**Figura 14: Estructura química del ácido polipórico.**

Este compuesto químico está presente en un 20-40% del peso seco de los carpóforos. Se encuentra en otros hongos, pero en cantidades mucho más bajas. Se conocen compuestos químicos basados en el núcleo de *p*-terfenilo, que muestran estructuras inusuales y propiedades biológicas interesantes; se encuentran esencialmente en hongos y líquenes. Estos compuestos y, en particular, los polihidroxi-*p*-terfenilos completamente aromáticos, presentan actividad citotóxica contra células tumorales y otras propiedades antiproliferativas, actividad antibacteriana, antioxidante o actividad de captación de radicales, actividad antiinflamatoria y otras propiedades de interés biomédico o agronómico (139). La administración oral de ácido polipórico en ratas permitió la reproducción de los signos relacionados con la ingestión de *H. rutilans* en humanos: las ratas desarrollaron alteraciones conductuales, disminución de la actividad motora y de la respuesta de colocación visual, insuficiencia hepatorenal, acidosis metabólica, hipocalcemia e hipocalcemia; también se obtuvieron análogos análisis de laboratorio. Así se evidenció que el ácido polipórico es la principal toxina en *H. rutilans* (136). La citotoxicidad se estableció en modelos de cultivo de neuronas de ratas (136).

**Mecanismo de acción:** El **ácido polipórico** inhibe a la enzima dihidroorotato-deshidrogenasa (136) y tiene cierta actividad antifúngica y antibacteriana (141). Se ha demostrado que es un intermediario en la biosíntesis de alantofuranona, un antibiótico *gamma*-lactona del hongo *Allantophomopsis lycopodina* (142).

**Especies causantes del micetismo:** División: Basidiomycota; Clase: Agaricomycetes; Orden: Polyporales; Familia: *Polyporaceae*; *Hapalopilus rutilans* = *Hapalopilus nidulans*.

## TRATAMIENTOS

La atención de apoyo es la base de la terapia de la mayoría de los pacientes con intoxicación por ingestión de los carpóforos de hongos tóxicos. La terapia específica se sigue de acuerdo con la presentación clínica del toxíndrome. La descontaminación gastrointestinal con carbón activado es de máximo beneficio cuando los pacientes se presentan dentro de la hora posterior a la ingestión. El vaciamiento gástrico por lavado gástrico presenta riesgos de aspiración.

En esta sección se analizarán los tratamientos correspondientes a los micetismos por amatoxinas y por giromitrina.

**Tratamiento del toxíndrome hepatotóxico o ciclopeptídico (micetismo por amatoxinas):**

Este micetismo se debe a la acción de las amatoxinas presentes en *Amanita phalloides* y especies similares. Recientemente se ha hecho una compilación de las intoxicaciones debidas a carpóforos que contienen amatoxinas (143). Más del 90% de todas los micetismos fatales en todo el mundo se deben a especies que contienen amatoxinas y que crecen abundantemente en Europa, el sur de Asia y el subcontinente de la India. Muchos casos también han sido reportados en América del Norte y América del Sur. *A. phalloides* es responsable de la mayoría de las muertes causadas por micetismo (> 20% en adultos, > 50% en niños) (144, 145). Causa daño hepático, renal y, raramente, en el páncreas, provocando coma encefalopático, coagulación intravascular diseminada, hemorragia y shock hipovolémico. De los componentes ciclopeptídicos presentes en los carpóforos sólo las amatoxinas son tóxicas por vía oral; las amatoxinas inhiben a la ARN polimerasa II eucariótica causando la detención de la transcripción, afectando principalmente a las células metabólicamente muy activas, como los hepatocitos y las células renales. Después de la larga fase de latencia, se inician los síntomas gastrointestinales y la rápida progresión de la insuficiencia hepática aguda que conduce a la falla multiorgánica y a la muerte en una semana, si no se trata. También una paciente intoxicada con *A. phalloides* presentó insuficiencia multiorgánica y shock cardiogénico debido a una disfunción sistólica ventricular izquierda avanzada (33). Posteriormente, tres pacientes intoxicados se vieron afectados por una disfunción cardíaca similar con compromiso de la función sistólica ventricular izquierda (34). El tratamiento del shock cardiogénico con balón de contrapulsación intraaórtico resultó exitoso logrando la recuperación de los pacientes, quienes no respondieron a otras terapias (33, 146). La intoxicación con amatoxinas es una emergencia médica caracterizada por un largo período de incubación, fases gastrointestinales y hepatotóxicas, coma y muerte. Se han hecho varias compilaciones sobre este tema, con énfasis en los casos clínicos, la atención médica preliminar, las medidas de apoyo, los tratamientos específicos utilizados individualmente o en combinación y el trasplante de hígado para los casos más graves. También se conoce la biodisponibilidad y la absorción oral de los ciclopeptidos (147). El paciente requiere internación inmediata. Los tratamientos específicos consisten en procedimientos de desintoxicación y la administración de fármacos. Las medidas de soporte están dirigidas a tratar la deshidratación (41). Se ha demostrado que el aumento de la eliminación con múltiples dosis de carbón activado disminuye la circulación de las amatoxinas después de la ingestión de las toxinas. La dosis recomendada es de 50 g (0,5g/kg) cada cuatro horas durante cuatro días. La hemodiálisis o la hemoperfusión no eliminan cantidades significativas de las toxinas, por lo que no se recomienda para su remoción, a menos que los pacientes presenten signos de insuficiencia renal aguda, que requiera hemodiálisis, en forma de hipercalemia, acidosis metabólica, signos urémicos y encefalopatía. Sin embargo, no existe una estrategia de tratamiento estándar y ningún antídoto contra la insuficiencia hepática. Se han propuesto técnicas de desintoxicación, en particular el uso de plasmaféresis o recambio plasmático terapéutico, en combinación con terapia de apoyo para remover los compuestos tóxicos presentes en el plasma, logrando así una reducción sustancial en las tasas de mortalidad que en algunos estudios han estado por debajo del 10% (148). Las principales complicaciones en el uso de estos procedimientos son infecciones y trastornos de la coagulación. Los mejores resultados

terapéuticos se pueden esperar cuando las técnicas de desintoxicación se aplican en combinación con terapias conservadoras dentro de las primeras 36-48 h después de la ingestión. Existe un creciente interés en los desarrollos logrados con los llamados dispositivos extracorpóreos de asistencia hepática, que ahora se usan ampliamente no sólo para aumentar la remoción de un tóxico, sino también para mejorar la eliminación de sustancias endógenas en la insuficiencia hepática aguda. La mayoría de las técnicas no bioartificiales se basan en el principio de la diálisis de albúmina, que se usa como transición al trasplante hepático (que a veces así se puede evitar) o después del mismo cuando hay disfunción del injerto y se quiere evitar un segundo trasplante (149). El objetivo es eliminar las sustancias unidas a la albúmina que podrían desempeñar un rol en la fisiopatología de la insuficiencia hepática aguda al dializar la sangre contra una solución que contiene albúmina a través de una membrana permeable de alto flujo. Todos los dispositivos de asistencia hepática extracorpórea son capaces en cierta medida de eliminar sustancias biológicas (amoníaco, urea, creatinina, bilirrubina, ácidos biliares, aminoácidos, citoquinas, agentes vasoactivos). Se ha demostrado una mejoría en la disfunción cardiovascular y neurológica, tanto en la insuficiencia hepática aguda como en la insuficiencia hepática aguda hacia crónica. Se ha desarrollado un dispositivo de apoyo hepático extracorpóreo de separación fraccionada de plasma, adsorción y diálisis, que permite la remoción de toxinas solubles en agua y unidas a la albúmina. Se comercializa con el nombre de Prometheus® (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Alemania) (150). Es una combinación de un tratamiento de hemodiálisis con un método de adsorción. Usando un filtro especial, la albúmina y las toxinas unidas a ella se separan de la sangre del paciente y pasan sobre un adsorbente para eliminar las toxinas (150). Las toxinas solubles en agua se eliminan por diálisis. La seguridad y eficacia de esta terapia se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*. El método se ha utilizado con éxito durante varios años en la insuficiencia hepática de diversos orígenes para desintoxicar la sangre (150). Por lo tanto, Prometheus® es una opción de tratamiento prometedora para los pacientes con insuficiencia hepática debida a micetismos. Se han estudiado 8 pacientes con micetismo; todos ellos se sometieron a 1 a 4 sistemas Prometheus® consecutivos además del tratamiento médico y de apoyo, como reemplazo de líquidos, Penicilina G, *N*-acetilcisteína y silimarina. Se evaluaron una variedad de parámetros clínicos y bioquímicos (151). Se observó una mejoría de los parámetros bioquímicos después del primer tratamiento con el sistema FPSA. Siete de los ocho pacientes sobrevivieron y fueron dados de alta para reanudar una vida independiente. Un paciente que tenía encefalopatía de grado III cuando ingresó en el hospital murió. No se observaron eventos adversos importantes durante la aplicación de esta modalidad de terapia (151). Pacientes con insuficiencia hepática aguda por intoxicación con *Amanita phalloides* comprobada (grupo de tratamiento con FPSA n = 9, grupo de control n = 11). La concentración de toxina de amanitina urinaria se midió con el kit Amanitin ELISA (Bühlmann Laboratories, Alemania; nivel de corte 1,5 ng/mL). Todos los pacientes recibieron tratamiento médico estándar con carbón activado, fluidos i.v. cristaloides, silibinina y *N*-acetilcisteína. Además, 9 pacientes se sometieron a tratamiento con Prometheus® hasta niveles indetectables de amanitina (152). No se observaron complicaciones hemodinámicas, respiratorias ni hematológicas. Ninguno de los pacientes tuvo que someterse a un trasplante de hígado. Todos los pacientes en el grupo de tratamiento sobrevivieron y fueron dados de alta totalmente recuperados. Un paciente en el grupo control murió debido a shock y acidosis láctica; un paciente permaneció dependiente

de diálisis. La duración media de la estancia hospitalaria fue de 7,1 días en el grupo de tratamiento y de 11,7 días en el grupo control ( $p = 0,30$ ) (152). También se observó que en pacientes críticamente enfermos por micetismo con *A. phalloides* y a espera de trasplante hepático, Prometheus® prolongó el tiempo de espera quirúrgico, dando en consecuencia la posibilidad de un procedimiento como el trasplante para salvar la vida(153). Dentro de los dispositivos extracorpóreos, el más utilizado es el Sistema de Recirculación de Adsorbente Molecular (MARS™: *Molecular Adsorbent Recirculating System*) (154). Se utilizó para intoxicaciones con *Amanita phalloides* como así también con otras especies del género *Amanita* sección *Phalloideae*, como *A. bisporigena* (155). Pacientes intoxicados, que presentaron lesión hepática aguda, fueron tratados con el sistema MARS®. Cuatro de ellos fueron incluidos en la lista de admisión para el trasplante de hígado de alta urgencia. Además del tratamiento médico estándar para la intoxicación con *A. phalloides*, se realizaron 16 sesiones de diálisis a los pacientes. Todos sobrevivieron con recuperación hepática completa sin necesidad de trasplante; no se informaron eventos adversos graves durante el tratamiento. La coagulopatía se resolvió en cuestión de días en todos los pacientes y la lesión renal aguda en todos menos uno (156). Es decir que, el dispositivo MARS resultó muy efectivo en el tratamiento de la intoxicación con *A. phalloides*. Dado que el mecanismo principal de la toxicidad de las amatoxinas se asocia con el bloqueo de la síntesis de proteínas en los hepatocitos se suelen usar terapias que eviten la captación de amatoxinas en los hepatocitos o disminuir la concentración de amatoxinas en la circulación enterohepática. Como, además, las amatoxinas presentan propiedades pro-oxidantes que pueden contribuir a la hepatotoxicidad severa, para contrarrestarlas se utilizan compuestos antioxidantes en el tratamiento. La terapia consiste en el uso de bencilpenicilina u otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, complejo de silimarina o silibinina pura, *N*-acetil-*L*-cisteína, ácido tióctico, fármacos antioxidantes, hormonas y esteroides administrados por separado, o más comúnmente, en combinación (41). En la práctica, no se encontraron beneficios para el uso de ácido tióctico o esteroides. Como hemos visto en pacientes intoxicados, los resultados van desde la recuperación completa hasta la falla fulminante de órganos y la muerte, lo que a veces puede evitarse con un trasplante hepático. No hay estudios clínicos controlados disponibles debido a razones éticas, pero se ha demostrado que los inhibidores de la captación de las amatoxinas, como silibinina o penicilina G intravenosa, se asocian con niveles más altos de supervivencia de los pacientes. Este bloqueo o inhibición causa el desvío de las amatoxinas de vuelta a la circulación general para el clearance renal, por lo que se mantiene la función renal; una brusca salida de orina es crucial para el éxito del fármaco (32). El antídoto más utilizado para tratar la intoxicación debida a hongos que contienen amanitinas es bencilpenicilina. La eficacia de bencilpenicilina se comparó con la de otros antibióticos como ceftazidima y rifamicina SV en el modelo de hepatocitos humanos (157). En el primer diseño experimental, los hepatocitos se expusieron simultáneamente a  $\alpha$ -amanitina y los antídotos a ensayar, mientras que en el segundo diseño, las células se expusieron durante las primeras 12 horas a  $\alpha$ -amanitina solamente, y luego, se intercambié el medio a uno conteniendo  $\alpha$ -amanitina y los antídotos a ensayar. Los resultados demostraron que la administración simultánea de  $\alpha$ -amanitina y cada uno de los antídotos ensayados (bencilpenicilina, ceftazidima y rifamicina SV) protegen eficazmente a los hepatocitos humanos; sin embargo, en el grupo dosificado con bencilpenicilina, se observó la mayor viabilidad de hepatocitos. En los cultivos celulares del segundo diseño experimental, todos los antídotos ensayados fueron ineficaces, lo que indica que después de que los



hepatocitos captaran la dosis crítica de  $\alpha$ -amanitina, la supresión adicional de este proceso no protege a las células contra la lesión (157). Por lo tanto, 12 horas de exposición de los hepatocitos incubados a  $\alpha$ -amanitina es un tiempo suficiente para tal captación celular de una dosis crítica de esta toxina. En resumen, se puede concluir que bencilpenicilina, de fácil acceso y bajo costo, debería ser ampliamente utilizada como antídoto contra amanitinas. Sin embargo, la clave para una terapia exitosa es la implementación rápida de un antídoto para proteger la porción más grande posible del parénquima hepático contra la captación devastadora de una dosis crítica de amanitinas. También se estudiaron los mecanismos de la apoptosis inducida por  $\alpha$ -amanitina en cultivo de hepatocitos humanos, demostrando que esta apoptosis es dependiente de p53 y caspasa-3 (158). Al exponer los cultivos de hepatocitos humanos simultáneamente a  $\alpha$ -amanitina y a bencilpenicilina y *N*-acetilcisteína, se vio que estos antídotos, comúnmente utilizados, protegen a los hepatocitos humanos contra esta apoptosis, ya que mostraron una viabilidad celular significativamente más alta y valores significativamente más bajos de marcadores de apoptosis en comparación con los cultivos expuestos solamente a  $\alpha$ -amanitina (158). Los ensayos no controlados y los informes de casos describen un tratamiento exitoso con silibinina intravenosa (Legalon® SIL) (159). En casi 1.500 casos documentados, la mortalidad global en pacientes tratados con Legalon® SIL es inferior al 10% en comparación con más del 20% cuando se usa penicilina o una combinación de silibinina y penicilina. Silibinina, un flavonolignano de acción antioxidante y antiinflamatoria comprobada, aislado de extractos de *Silybum marianum* (“cardo mariano”), ha demostrado interactuar con proteínas específicas del transporte hepático, bloqueando la re-captación celular de amatoxinas e interrumpiendo así la circulación enterohepática de la toxina. La adición de silibinina por vía intravenosa al manejo agresivo de fluidos intravenosos sirve para detener y permitir la reversión de la manifestación de insuficiencia hepática fulminante, aún en pacientes gravemente intoxicados (159). Estos hallazgos, junto con la experiencia clínica disponible, justifican el uso de silibinina en los casos de intoxicación por *Amanita* (160). La silibinina se administra durante 6 días o hasta que el paciente se recupere. Se considera el uso de penicilina G intravenosa, cuando no se dispone de silibinina. La penicilina G probablemente actúa por inhibición competitiva de la unión de las amatoxinas a las proteínas plasmáticas, provocando así exceso de excreción urinaria de las toxinas; también actúa como inhibidor de la captación. Se comparó en pacientes el tratamiento de la intoxicación con amatoxinas con silibinina sola y en combinación con penicilina. Se observó una tasa de muerte y trasplante más baja en el grupo de tratamiento con silibinina sola, que en el grupo tratado con silibinina combinada con penicilina (161). Otro tratamiento efectivo es el uso de silimarina, extracto obtenido de la planta *Silybum marianum* (“cardo mariano”) por sus propiedades hepatoprotectoras. *In vitro* demostró bloquear el ingreso de las amatoxinas a los hepatocitos (47). También ceftazidima es otro inhibidor de la captación de amatoxinas que ha resultado efectivo en el tratamiento. Bencilpenicilina, ceftazidima y silibina han sido frecuentemente usadas en el tratamiento de la intoxicación con  $\alpha$ -amanitina, principalmente basadas en razones empíricas, pero hace pocos años se hicieron estudios *in silico* sobre la inhibición de ARN polimerasa II por  $\alpha$ -amanitina y también sobre la interacción de estos tres antídotos en el sitio activo de esta enzima (162). Los resultados revelaron que  $\alpha$ -amanitina afecta la transcripción de ARN polimerasa II al comprometer la función del loop de activación (TL: *trigger loop*). Las interacciones directas observadas entre  $\alpha$ -amanitina y los residuos de loop de activación: Leu1081, Asn1082, Thr1083, His1085 y Gly1088, modifican el proceso de

elongación y contribuyen así a la inhibición de la ARN polimerasa II. También se presentaron evidencias de que  $\alpha$ -amanitina puede interactuar directamente con los residuos de la hélice puente, Gly819, Gly820 y Glu822, e indirectamente con His816 y Phe815. Esto desestabiliza la hélice puente, causando la pérdida de actividad de ARN polimerasa II (162). Se demostró que bencilpenicilina, ceftazidima y silibina son capaces de unirse al mismo sitio que  $\alpha$ -amanitina, si bien no replicando el único modo de unión de  $\alpha$ -amanitina. Estos antídotos establecen menos interacciones intermoleculares y las que existen son confinadas a la hélice puente y los residuos adyacentes. Por lo tanto, el efecto terapéutico de estos antídotos no parece estar sólo relacionado con la unión a ARN polimerasa II. El sitio de unión de  $\alpha$ -amanitina a ARN polimerasa II se puede dividir en zonas específicas con diferentes propiedades que dan las mejores condiciones para el diseño de nuevos antídotos para la intoxicación con  $\alpha$ -amatoxina. Un candidato ideal debería unirse competitivamente a ARN polimerasa II, interaccionando con Arg726, Ile756, Ala759, Gln760 y Gln767, pero no con los residuos del loop de activación y de la hélice puente (162). También polimixina B resultó un antídoto muy satisfactorio. Se hicieron estudios *in silico* con polimixina B, que es un fármaco clínico que comparte similitudes químicas con  $\alpha$ -amanitina. Los resultados mostraron que polimixina B se une potencialmente a ARN polimerasa II en la misma interfaz de  $\alpha$ -amanitina, evitando que la toxina se una a ARN polimerasa II (163). *In vivo*, la inhibición de los transcritos de ARNm provocada por  $\alpha$ -amanitina fue revertida eficientemente por polimixina B en los riñones. Además, polimixina B disminuyó significativamente la lesión hepática y renal inducida por  $\alpha$ -amanitina, como se manifestó por la histología y los datos de las aminotransferasas hepáticas plasmáticas. En el ensayo de supervivencia, todos los animales expuestos a  $\alpha$ -amanitina murieron dentro de los 5 días, mientras que 50% sobrevivieron hasta 30 días cuando se administró polimixina B 4, 8 y 12 horas después de  $\alpha$ -amanitina. Más aún, una sola dosis de polimixina B administrada concomitantemente con  $\alpha$ -amanitina fue capaz de garantizar el 100% de supervivencia. En conclusión, polimixina B protege a ARN polimerasa II de la inactivación, lo que conduce a una prevención efectiva del daño orgánico y a una mayor supervivencia en animales tratados con  $\alpha$ -amanitina (163). Los antioxidantes también están indicados en la intoxicación con amatoxinas, ya que previenen la peroxidación lipídica que está aumentada por las toxinas, contribuyendo así a la inestabilidad de las membranas y a la muerte celular. El antioxidante preferido es *N*-acetilcisteína inyectable. Se demostró en cultivo de hepatocitos humanos, que la exposición de 48 horas a  $\alpha$ -amanitina a una concentración de 2  $\mu$ M provocó un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa, una disminución de la actividad de catalasa y un aumento significativo en la peroxidación lipídica (164). Los cambios en la actividad de superóxido dismutasa y de catalasa causados por  $\alpha$ -amanitina probablemente podrían aumentar la peroxidación lipídica mediante una mayor generación de peróxido de hidrógeno, combinado con una menor desintoxicación de esa especie oxigenada. La adición de antídotos (*N*-acetil-*L*-cisteína y/o silibinina) al medio de cultivo proporcionó una protección más efectiva contra la peroxidación lipídica en hepatocitos humanos intoxicados con  $\alpha$ -amanitina que la adición de bencilpenicilina, que no posee propiedades antioxidantes (164). Dado que no existe un antídoto efectivo contra la intoxicación por amatoxinas y que  $\alpha$ -amanitina es el componente principal de las mismas, recientemente se desarrolló un aptámero de ADN que presenta unión específica a  $\alpha$ -amanitina (165). Este aptámero se seleccionó usando el método SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*: Evolución Sistemática de Ligandos por

Enriquecimiento Exponencial). Luego, se confirmó su capacidad de remoción de toxinas de la solución acuosa mediante un ensayo de disminución (“*pull-down assay*”). Se determinó la región del aptámero suficiente para la unión a  $\alpha$ -amanitina. Finalmente, se calculó la constante de disociación del complejo  $\alpha$ -amanitina/aptámero de ADN (165). También se usa el octreótido u octreotida (nombre comercial Sandostatina, entre otros), que es un octapéptido cíclico análogo de la somatostatina natural y, por tanto, con efectos farmacológicos similares, pero con mayor duración de la acción y una potencia 1,3 veces mayor (166). Actúa principalmente como inhibidor de la secreción patológicamente aumentada de la hormona de crecimiento, y otros péptidos como el glucagón, insulina, serotonina, gastrina; sintetizados en el sistema endocrinogastro-entero-pancreático. El octreótido intravenoso ayuda a mantener a las amatoxinas contenidas en la vesícula biliar y, por lo tanto, limita su exposición posterior a los hepatocitos (166). El octreótido inhibe eficazmente el flujo biliar desde el conducto biliar común y la vesícula biliar mediante el aumento de la presión en el esfínter de Oddi y mejora el llenado de la vesícula biliar al reducir la presión intraluminal de la misma. Se ha demostrado que el drenaje biliar mediante radiología intervencionista (aspiración simple/seriada de vesícula biliar, colecistostomía percutánea), cirugía general (colecistostomía abierta) o gastrointestinal (drenaje nasobiliar con succión ubicada mediante *colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE)*) ha resultado eficaz en un número creciente de casos. Recientemente se ha estudiado en perros de raza Beagle (68). La eliminación de la bilis, cargada de amatoxinas, de la vesícula biliar proporciona una protección definitiva a los hepatocitos no afectados al eliminar la exposición enterohepática adicional al veneno. La aspiración simple de la vesícula biliar guiada por ultrasonido parece ser el medio más rápido, más seguro, más fácil y más eficiente de eliminar del tracto biliar permanentemente las amatoxinas acumuladas. Se puede lograr utilizando un abordaje transhepático al principio del curso clínico o mediante un enfoque transperitoneal si el coeficiente o relación internacional normalizada (INR: *International Normalized Ratio*) es superior a 2 (INR < 2 mayor riesgo de trombosis o embolias). La muestra de bilis recolectada debe ser etiquetada y congelada cuidadosamente para el posterior análisis del contenido de amatoxinas.

**Tratamiento del toxíndrome giromitrínico o neurotóxico epileptogénico (micetismo por giromitrina):**

La mayoría de los pacientes desarrollan sólo síntomas gastrointestinales leves y se recuperan por completo en varios días después de la exposición. El tratamiento es principalmente de apoyo. Considerando que los compuestos tóxicos de hongos del género *Gyromitra* pueden afectar varios sistemas de órganos, se debe controlar la glucemia, los niveles de metahemoglobina, la hemoglobina libre y la función hepática y renal. Cuando se detecta metahemoglobinemia en la intoxicación con giromitrina el paciente debe recibir azul de metileno por vía intravenosa. La descontaminación sólo se recomienda si los pacientes se presentan unas pocas horas después de la exposición, pero muchas veces no es posible debido a la aparición tardía de los signos clínicos. Se ha recomendado la administración de carbón activado, aunque no se han realizado estudios de eficacia. Por lo tanto, si se administra carbón activado se requiere monitoreo permanente y cuidadoso para detectar desequilibrios electrolíticos, hemólisis y metahemoglobinemia. La corrección de líquidos y electrolitos son medidas importantes junto con la administración de piridoxina (167). Se recomienda piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) para los signos neurológicos graves en pacientes, como convulsiones y coma, junto con terapia anticonvulsiva. La dosis

recomendada es de 25 mg/kg de piridoxina por vía intravenosa durante 15 a 30 minutos. Los signos neurológicos recurrentes pueden requerir dosis adicionales, hasta un máximo de 15 a 20 g/día (88). La dosificación no debe exceder 20 g/día. La piridoxina actúa revirtiendo la deficiencia de fosfato de piridoxal (o piridoxal-5-fosfato; forma metabólicamente activa de la vitamina B<sub>6</sub>) en el sistema nervioso central mediado por el metabolito tóxico *N*-metilhidrazina. La piridoxina se ha asociado con una neuropatía sensitiva profunda, relacionada con la exposición acumulativa a largo plazo o producida después de la administración a corto plazo de dosis grandes. Con exposiciones particularmente grandes, la pérdida sensorial puede ser prácticamente completa, incluidas las áreas de las membranas faciales y mucosas, y produce ataxia y movimientos coreoatetoideos. Tal pérdida profunda es consistente con una neuropatía sensitiva (168). La debilidad aparente puede estar relacionada con la propiocepción alterada. La neuropatía sensitiva inducida por piridoxina es indistinguible de la neuropatía sensitiva paraneoplásica. Se han realizado estudios electrofisiológicos secuenciales (169). Dado que la neurotoxicidad debida a piridoxina descrita anteriormente se ha observado en pacientes, las dosis grandes se deben administrar con precaución y por períodos limitados. La piridoxina puede controlar con éxito la actividad convulsiva, pero no brinda beneficio alguno en prevenir la lesión hepática. El daño oxidativo a los glóbulos rojos y la lesión hepática y renal pueden desarrollarse a partir de los metabolitos reactivos (88). La piridoxina se puede usar sola o en combinación con diazepam. La terapia de combinación tiene una mejor eficacia que la piridoxina sola (167). Fenobarbital no se recomienda para el control de las convulsiones debido a su capacidad de inducir citocromo P<sub>450</sub>. La administración de ácido fólico (llamado también factor citrovorum o leucovorina), generalmente administrado como folinato de calcio, se ha recomendado en humanos, pero no se han realizado estudios controlados. Para prevenir la lesión hepática se debe considerar el uso de cimetidina, inhibidor del citocromo P<sub>450</sub>, y *N*-acetilcisteína, con la misma dosificación que para lesión hepática inducida por paracetamol. La hemodiálisis ha sido reportada en la literatura en el tratamiento de la intoxicación con giromitrina, pero se desconoce su rol en la remoción de giromitrina o sus metabolitos tóxicos. Si se ha producido una lesión hepática grave, las medidas terapéuticas requieren el mismo tratamiento de apoyo que se describe para la intoxicación con amatoxinas (88).

**Micetismos en Buenos Aires y alrededores (Argentina):** El Prof. Jorge Wright fue quien creó el instituto-Programa PRHIDEB de la Universidad de Buenos Aires (UBA)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) dedicado al estudio de hongos, taxonomía y bioactividad. Uno de los autores del presente trabajo (ABP) crea en esos años el instituto-Programa PROPLAME de UBA-CONICET dedicado al estudio de compuestos orgánicos activos presentes en plantas tóxicas y medicinales y metabolismo de relación, que culmina en la fusión de ambos institutos-programas, cuando el director de PRHIDEB era el Prof. Dr. Daniel Cabral. En cumplimiento de lo que esperaban los fundadores y directores de ambas instituciones, actualmente allí funciona el “**Servicio de Identificación de Hongos Tóxicos**”, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA; Pabellón 2, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental); lo integran los investigadores que continúan con PROPLAME-PRHIDEB (UBA-CONICET) que colabora con servicios médicos, estatales y privados, identificando los hongos remitidos en casos de micetismos, permitiendo así, en muchos casos, realizar el tratamiento médico adecuado. En una publicación del 2013 (8) dieron a

conocer los casos atendidos por el servicio desde 1985 hasta 2012 inclusive, además de una tabla para reconocer las especies tóxicas más comunes de la región.

### **Conclusiones**

Debido a la cantidad de micetismos actualmente conocidos y los nuevos que van surgiendo cada año, se propone en este trabajo una clasificación según los tiempos de latencia registrados en las unidades de emergencia médica de la región e internacionales. Surgen así los toxíndromes tardíos, demorados y tempranos o precoces. Los síndromes tardíos y los demorados son considerados los más graves. En esta serie de tres artículos, en esta primera parte se presentan los síndromes tardíos caracterizados por transcurrir 6 a 24 horas hasta la aparición de síntomas y signos clínicos en los pacientes. De acuerdo a la experiencia de los autores en los casos clínicos, existe gran confusión en las guardias médicas ante pacientes intoxicados por ingestión de macromicetos, por lo que a veces hay demora en establecer el diagnóstico, o bien se realizan maniobras inadecuadas. Pero en los micetismos una estrategia equivocada o tardía puede realmente llevar a la muerte. Por ejemplo, dada la premura de la intervención precoz en el síndrome hepatotóxico, se tiene que seguir un protocolo rápido ante este tipo de casos de intoxicación, que puede facilitar el diagnóstico diferencial. La identificación de los carpóforos por servicios especializados, como el que mencionáramos para Buenos Aires y alrededores, es importante para establecer un diagnóstico preciso y rápido. En realidad, la gran mayoría de los casos de micetismo corresponden a síndromes gastrointestinales, o bien, al síndrome hepatotóxico, que se distinguen por el período de latencia corta y larga respectivamente. Ambos tienen usualmente un cuadro inicial similar de diarreas, náuseas y vómitos, que además es compartido con otros síndromes. Por lo tanto, es importante señalar cómo hacer un diagnóstico diferencial. Para la clasificación de un caso como hepatotóxico, un período de latencia superior a seis horas, hasta la aparición de los primeros síntomas gastroentéricos, es uno de los parámetros para la distinción del síndrome gastrointestinal, mucho menos grave y de latencia muy corta. Si bien los pacientes cuyo cuadro clínico presenta un período de latencia corto tienen un mejor pronóstico, se debe realizar el monitoreo durante 24 horas, pues algunos síndromes de latencia corta comparten esta presentación inicial, pero requieren otras medidas terapéuticas específicas, como ya veremos en otro de los artículos. Los síndromes hepatotóxico y nefrotóxico presentados en este trabajo, potencialmente más graves, tienen un período de latencia superior a seis horas. Por ejemplo, el cuadro suele iniciarse a la mañana siguiente después de haber consumido los carpóforos en la cena.

Se debe aclarar que el síndrome hepatotóxico presenta una fase de mejora clínica, en la que no se debe confiar, que aparece después de un primer cuadro típicamente gastrointestinal. En esa fase de falsa mejoría continúa la acción tóxica de los ciclopéptidos, que llevará a insuficiencia hepática y/o renal con manifestaciones clínicas tardías y potencialmente letales. La complicación adicional está dada por la falta de disponibilidad de métodos de detección de toxinas hepáticas en la mayoría de las unidades toxicológicas. Si bien ya se han desarrollado, en varios laboratorios internacionales y en los de los autores, métodos de detección de  $\alpha$ -amanitina en circulación, así como también de amatoxinas en fluidos biológicos. El método de elección en la detección de estas intoxicaciones es, sin duda, el monitoreo de la función y lesión hepática, que puede realizarse mediante los siguientes marcadores: tasa de protrombina (TP), análisis de transaminasas, en particular de aspartato-transaminasa (AST) o aspartato-aminotransferasa (*EC* 2.6.1.1) y de bilirrubina. También es relevante el control estricto de la función renal, pues es relativamente común el

desarrollo de insuficiencia renal aguda, no sólo en el síndrome nefrotóxico sino también durante los cuadros de intoxicación por ciclopéptidos, que causan deshidratación por la gastroenteritis severa y por la acción de las toxinas en los túbulos renales. El perfil evolutivo de la tasa de protrombina (TP), la aspartato-transaminasa (AST) y la bilirrubina es importante para el diagnóstico y la definición del pronóstico (170). AST aumenta en los primeros dos o tres días, con un aumento concomitante de TP, por eso tiene un rol esencial en el diagnóstico de hepatotoxicidad, pero no es un buen indicador de la evolución clínica. Se espera la disminución temprana de TP debido al reducido tiempo de semivida del factor VII. Si no hay recuperación a valores normales de TP continúa la insuficiencia hepática. La elevación tardía de la bilirrubina hace que no sirva para la fase de diagnóstico, pero alcanza valores más altos y precoces en los casos fatales, por lo que parece tener un valor pronóstico. Un correcto seguimiento clínico requiere el análisis conjunto de estos tres parámetros. La existencia de antecedentes de patología hepática no debe ser subestimada, ya que puede ser predictiva de un resultado desfavorable, por lo que resulta de valor una anamnesis cuidadosa. De acuerdo a todo lo tratado, urge la realización de más investigación y de mejor divulgación del tema en el mundo biomédico, así como la adopción de protocolos de intervención claros y de fácil acceso a todos los profesionales de la salud.

#### **Agradecimientos:**

Al Hospital de Clínicas y a la Universidad de Buenos Aires por la infraestructura brindada; al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (Mincyt, Argentina) por las facilidades de acceso a la biblioteca electrónica. A.B.P. es Investigadora Superior de CONICET.

#### **Referencias:**

1. Piqueras Carrasco J. *Intoxicaciones por plantas y hongos*. Editorial Masson, Barcelona, 1996.
2. Wright JE, Albertó E. *Guía de hongos de la región pampeana. I. Hongos con laminillas*. Editorial LOLA, Buenos Aires, 2002.
3. Diaz JH. Evolving global epidemiology, syndromic classification, general management, and prevention of unknown mushroom poisonings. *Crit Care Med*2005; 33 (2): 419-26.
4. Diaz JH. Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings. *Crit Care Med*2005; 33 (2): 427-36.
5. Liu J-K. N-Containing compounds of Macromycetes. *Chem Rev* 2005; 105 (7): 2723-44.
6. Lechner BE, Albertó E. Especies tóxicas de Agaricales halladas en la Argentina: nueva cita de *Amanita pantherina* y reevaluación de la comestibilidad de *Tricholoma equestre*. *Bol Soc Argent Bot* 2008; 43 (3-4): 227-35.
7. Lima ADL, Costa Fortes R, Carvalho Garbi Novaes MR, Percário S. Poisonous mushrooms: a review of the most common intoxications. *Nutr Hosp*2012; 27 (2): 402-8.
8. Romano GM, Iannone L, Novas MV, Carmarán C, Romero AI, Lopez SE, Lechner BE. Hongos tóxicos en la ciudad de Buenos Aires y alrededores. *Medicina (Buenos Aires)* 2013; 73: 406-10.
9. Graeme KA. Mycetism: a review of the recent literature. *J Med Toxicol* 2014; 10 (2): 173-89.
10. Gry J, Andersson C. *Mushrooms traded as food*. Vol. II , sec. 2. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Dinamarca, 2014.
11. Parnmen S, Sikaphan S, Leudang S, Boonpratuang T, Rangsiruji A, Naksuwankul K. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS region and peptide



- toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *J Toxicol Sci* 2016; 41 (1): 65-76.
12. Homer JA, Sperry J. Mushroom-derived indole alkaloids. *J Nat Prod* 2017; 80 (7): 2178-87.
13. Battista M, Vitale A, Pomilio AB. Relationship between the conformation of the cyclopeptides isolated from the fungus *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. and its toxicity. *Molecules* 2000; 5: 489-90.
14. Pomilio AB, Battista M, Vitale A. Semiempirical AM1 and *ab initio* parameters of the lethal cyclopeptides *alpha*-amanitin and its related thioether, *S*-sulphoxide, sulphone, and *O*-methyl derivative. *J Mol Struct Theochem* 2001; 536: 243-62.
15. Pomilio AB, Battista ME, Vitale AA. Estructuras de las toxinas de hongos superiores. *Industria y Química* 2006; (352): 19-27.
16. Pomilio AB, Battista ME, Vitale A.A. Naturally occurring cyclopeptides: Structures and bioactivity. *Curr Org Chem* 2006; 10 (16): 2075-121.
17. Battista ME, Rodríguez SR, Vitale AA, Pomilio AB, Albónico JF, Alonso A. Reactividad cruzada entre los venenos de serpiente, de abeja y las toxinas del hongo *Amanita phalloides*. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64 (Supl 1): 66-7.
18. Pomilio AB, Battista SM, Vitale AA. I. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies on bioactive cyclopeptides. En: Castro EA (Chief Editor), *QSPR-QSAR Studies on Desired Properties for Drug Design*. Research Signpost, Kerala, India; Managing Editor: S.G. Pandalai SG, Chapter 1, 2010; pp. 1-34. [http://issuu.com/researchsignpost/docs/castro\\_e\\_book](http://issuu.com/researchsignpost/docs/castro_e_book)
19. Pomilio AB, Battista ME, Vitale AA, Battista SM, Ricciardi AIA, Alonso A.: Neutralización heteróloga e interacción de amanitinas con venenos de *Bothrops* y *Crotalus* y de abeja. [Heterologous neutralization and interaction of toxic amanitins with *Bothrops* and *Crotalus* venoms, and honey bee venom]. *Acta Bioq Clín Latinoamer* 2012; 46 (2): 171-82.
20. Pomilio AB, Battista SM, Vitale AA. Antimicrobial and immunosuppressive activities of cyclopeptides as targets for medicinal chemistry. En: *Chemometrics Applications and Research: QSAR in Medicinal Chemistry*. Chapter 8, Apple Academic Press, exclusive worldwide distribution by CRC Press, a Taylor & Francis Group, 2016; pp. 253-97.
21. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 1. *Amanitaceae*, *Pluteaceae* and *Hygrophoraceae*. *Mycotaxon* 2012; 119: 493-4.
22. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 2. *Coprinaceae* and *Strophariaceae*. *Mycotaxon* 2012; 120: 505.
23. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 3. *Bolbitiaceae* and *Crepidotaceae*. *Mycotaxon* 2012; 120: 505.
24. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 4. *Tricholomataceae* and *Polyporaceae*. *Mycotaxon* 2012; 121: 499-500.
25. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 5. *Agaricaceae*. *Mycotaxon* 2013; 122: 491.
26. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 6. *Paxillaceae*, *Gomphidiaceae*, *Boletaceae* and *Russulaceae*. *Mycotaxon* 2013; 123: 491.
27. Niveiro N, Albertó E. Checklist of the Argentine *Agaricales* 7. *Cortinariaceae* and *Entolomataceae*. *Check List* 2014; 10 (1): 72-96.
28. Degenkolb T, Vilcinskis A. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol*



2016; 100: 3813-24.

29. Hawksworth DL, Wiltshire PE, Webb JA. Rarely reported fungal spores and structures: An overlooked source of probative trace evidence in criminal investigations. *Forensic Sci Int* 2016; 264: 41-6.

30. Ferreirós Gago L. Síndromes toxicológicas. *Rev Hosp Niños BAires* 2013; 55 (248): 10-3.

31. Trakulsrichai S, Sriapha C, Tongpoo A, Udomsubpayakul U, Wongvisavakorn S, Srisuma S, et al. Clinical characteristics and outcome of toxicity from *Amanita* mushroom poisoning. *Int J Gen Med* 2017; 10: 395-400.

32. Ward J, Kapadia K, Brush E, Salhanick SD. Amatoxin poisoning: case reports and review of current therapies. *J Emerg Med* 2013; 44 (1): 116-21.

33. Aygul N, Duzenli MA, Ozdemir K, Altunkeser BB. A case report of an unusual complication of *Amanita phalloides* poisoning: development of cardiogenic shock and its successful treatment with intra-aortic balloon counterpulsation. *Toxicon* 2010; 55 (2-3): 630-2.

34. Altintepe L, Yazici R, Yazici M, Solak Y, Topal M, Isik A, Guney I. Temporary left ventricular dysfunction in mushroom poisoning: report of three cases. *Ren Fai* 2014; 36 (8): 1337-9.

35. Wieland T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem* 1978; 5 (3): 185-260.

36. Wieland T. The toxic peptides from *Amanita* mushrooms. *Int J Pept Protein Res* 1983; 22 (3): 257-76.

37. Wieland T., Faulstich H. Fifty years of amanitin. *Experientia* 1991; 47 (11-12): 1186-93.

38. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998; 36 (1): 13-24.

39. Walton J. Chemistry of the *Amanita* peptide toxins. En: *The Cyclic Peptide Toxins of Amanita and Other Poisonous Mushrooms*. Springer, Cham, 2018; pp. 19-57.

40. Baumann K, Muenter K, Faulstich H. Identification of structural features involved in binding of  $\alpha$ -amanitin to a monoclonal antibody. *Biochemistry* 1993; 32 (15): 4043-50.

41. Enjalbert F, Rapior S, Nouguier-Soulé J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002; 40 (6): 715-57.

42. Sgambelluri RM, Epis S, Sasseria D, Luo H, Angelos ER, Walton JD. Profiling of amatoxins and phallotoxins in the genus *Lepiota* by liquid chromatography combined with uv absorbance and mass spectrometry. *Toxins* 2014; 6 (8): 2336-47.

43. Garcia J, Oliveira A, de Pinho PG, Freitas V, Carvalho A, Baptista P, et al. Determination of amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* mushrooms from northeastern Portugal by HPLC-DAD-MS. *Mycologia* 2015; 107 (4): 679-87.

44. Talamoni M, Cabrerizo S, Cari C, Diaz M, Ortiz de Rozas M, Sager I. Intoxicación por *Amanita phalloides*, diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr* 2006; 104 (4): 372-4.

45. Rodríguez-Maldonado MG, López-Álvarez F, Andrade Padilla MA. Intoxicación por hongos: A propósito de un niño con falla hepática (Mushrooms poisoning: On purpose of a child with hepatic failure). *Rev Mex Pediatría* 2008; 75 (4): 171-4.

46. Pérez Gordillo JH, Colbert Rodríguez M, Cuz Rivera N, Pérez Gordillo G. Falla hepática fulminante por intoxicación por *Amanita verna*. Reporte de tres casos. *Rev Hosp Jua Mex* 2009; 76 (3): 168-75.

47. Cortese S, Risso M, Trapassi JH. Intoxicación con *Amanita phalloides*: serie de tres casos. [*Amanita phalloides* poisoning: series of three cases]. *Acta Toxicol Argent* 2013; 21 (2): 110-7.
48. Barquero M, Bolaños P. Falla hepática aguda y otros trastornos causados por el consumo de *Amanita phalloides*. *Med Leg Costa Rica* 2016; 33 (1): 96-102.
49. Garcia J, Costa VM, Baptista P, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. Quantification of *alpha*-amanitin in biological samples by HPLC using simultaneous UV-diode array and electrochemical detection. *J Chromatogr B* 2015; 997: 85-95.
50. Wieland T. *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms*. Springer: Berlin, 1986.
51. Loranger A, Tuchweber B, Gicquaud C, St-Pierre S, Côté MG. Toxicity of peptides of *Amanita virosa* mushrooms in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5 (6 Pt 1): 1144-52.
52. Antonyuk VO, Klyuchivska OY, Stoika RS. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: purification, characteristics and action towards mammalian cells. *Toxicon* 2010; 55 (7): 1297-305.
53. Wei J, Wu J, Chen J, Wu B, He Z, Zhang P, et al. Determination of cyclopeptide toxins in *Amanita subpallidrosea* and *Amanita virosa* by high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Toxicon* 2017; 133: 26-32.
54. Faulstich H, Buku A, Bodenmüller H, Wieland T. Virotoxins: actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms. *Biochemistry* 1980; 19 (14): 3334-43.
55. Walton J. Biosynthesis of the *Amanita* cyclic peptide toxins. En: *The Cyclic Peptide Toxins of Amanita and Other Poisonous Mushrooms*. Springer, Cham, 2018; 93-130.
56. Stasyk T, Lootsik M, Hellman U, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Stoika R. A new toxic protein from death cap *Amanita phalloides*: isolation and study of cytotoxic activity. *Studia Biologica* 2008; 2 (1): 21-32.
57. Pišlar A, Sabotič J, Šlenc J, Brzin J, Kos J. Cytotoxic *L*-amino-acid oxidases from *Amanita phalloides* and *Clitocybe geotropa* induce caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Discov* 2016; 2: 16021.
58. Stasyk T, Lutsik-Kordovsky M, Wernstedt C, Antonyuk V, Klyuchivska O, Souchelnytskyi S, Hellman U, Stoika R. A new highly toxic protein isolated from the death cap *Amanita phalloides* is an *L*-amino acid oxidase. *FEBS J* 2010; 277 (5): 1260-9.
59. Žun G, Kos J, Sabotič J. Higher fungi are a rich source of *L*-amino acid oxidases. *3 Biotech* 2017; 7 (3): 230.
60. Meldolesi J, Pelosi G, Brunelli A, Genovese E. Electron microscopic studies on the effects of amanitin in mice: liver and heart lesions. *Virchows Arch - Pathol Anat Physiol Klin Med* 1967; 342 (3): 221-35.
61. Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 1987; 105 (4): 1473-8.
62. Silva DA, Weiss DR, Pardo Avila F, Da L-T, Levitt M, Wang D, Huang X. Millisecond dynamics of RNA polymerase II translocation at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111 (21): 7665-70.
63. Marinozzi V, Fiume L. Effects of  $\alpha$ -amanitin on mouse and rat liver cell nuclei. *Exp Cell Res* 1971; 67 (2): 311-22.
64. Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. Structural basis of transcription:  $\alpha$ -amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (3): 1218-22.

65. Horgen PA, Vaisius AC, Ammirati JF. The insensitivity of mushroom nuclear RNA polymerase activity to inhibition by amatoxins. *Arch Microbiol* 2016; 118: 317-9.
66. Raithelhuber J. *Nueva Flora Micológica Argentina*. Mycosur, Stuttgart, 2004.
67. Yarze JC, Tulloss RE. Acute liver injury and renal failure due to poisonous mushroom (*Amanita bisporigera*) ingestion. *Am J Gastroenterol* 2012; 107 (5): 790-1.
68. Sun J, Zhang YT, Niu YM, Li HJ, Yin Y, Zhang YZ, et al. Effect of biliary drainage on the toxicity and toxicokinetics of *Amanita exitialis* in beagles. *Toxins (Basel)* 2018; 10(6): pii: E215.
69. Zhou Q, Tang S-S, He Z-M, Luo T, Chen Z-H, Zhang P. Amatoxin and phallotoxin concentrations in *Amanita fuliginea*: Influence of tissues, developmental stages and collection sites. *Mycoscience* 2017; 58(4), 267-73.
70. Yilmaz I, Kaya E, Sinirlioglu ZA, Bayram R, Surmen MG, Colakoglu S. Clinical importance of toxin concentration in *Amanita verna* mushroom. *Toxicon* 2014; 87: 68-75.
71. Ramarodi EA. Flora micológica de Bahía Blanca y zona. 2 parte. *Metrodiana* 1985; 11 (2): 51-2.
72. Wright JE, Wright E. Checklist of the mycobiota of Iguazú National Park (Misiones, Argentina). *Bol Soc Argent Bot* 2005; 40 (1-2): 23-44.
73. Wright JE, Lechner BE, Popoff OF. *Hongos. Acta pictórico del Parque Nacional Iguazú*. Editorial LOLA, Buenos Aires, 2008.
74. Kim SY, Baek YH, Han SY, Lee SW, Roh YH, Kim KW, et al. Mushroom poisoning by *Macrolepiota neomastoidea*. *Korean J Gastroenterol* 2018; 71 (2): 94-7.
75. Greenberg M. *Greenberg's Text-atlas of Emergency Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005; p. 854.
76. Saviuc P, Danel V. New Syndromes in mushroom poisoning. *Toxicol. Rev* 2006; 25 (3): 199-209.
77. Iwafuchi Y, Morita T, Kobayashi H, Kasuga K, Ito K, Nakagawa O, et al. Delayed onset acute renal failure associated with *Amanita pseudoporphyria hongo* ingestion. *Int Med* 2003; 42 (1): 78-81.
78. Besancon A, Schmitt C, Glaizal M, Tichadou L, Klouche K, Hayek-Lanthois M, et al. Survenue d'une atteinte cardiaque sévère au cours du syndrome proximien: deux observations originales. [Occurrence of severe cardiac alterations in *Amanita proxima* poisoning: two original observations]. [Artículo en idioma francés]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2012; 31 (5): 466-8.
79. Chilton WS, Tsou G. A chloro amino acid from *Amanita solitaria*. *Phytochemistry* 1972; 11 (9): 2853-7.
80. Hatanaka S I. Identification of 2-amino-4,5-hexadienoic acid from *Amanita pseudoporphyria*. *Lloydia* 1975; 38 (3): 273-4.
81. Yang W-S, Lin C-H, Huang J-W, Fang C-C. Acute renal failure caused by mushroom poisoning. *J Formos Med Assoc* 2006; 105 (3): 263-7.
82. Shu-ting C, Xiaolan M. *Hong Kong Mushrooms*. Sha Tin NT, Hong Kong: The Chinese University Press, 1995; p. 103.
83. Fushiya S, Gu QQ, Ishikawa K, Funayama S, Nozoe S. (2R),(1'R) and (2R),(1'S)-2-Amino-3-(1,2-dicarboxyethylthio)propanoic acids from *Amanita pantherina*. Antagonists of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors. *Chem Pharm Bull* 1993; 41 (3): 484-6.
84. Lertratanangkoon K, Scimeca JM, Wei JN. Inhibition of glutathione synthesis with propargylglycine enhances N-acetylmethionine protection and methylation in

- bromobenzene-treated Syrian hamsters. *J Nutr* 1999; 129 (3): 649-56.
85. Courtin P, Gallardo M, Berrouba A, Drouet G, de Haro L. Renal failure after ingestion of *Amanita proxima*. *Clin Toxicol (Phila)* 2009; 47 (9): 906-8.
86. West PL, Lindgren J, Horowitz BZ. *Amanita smithiana* mushroom ingestion: a case of delayed renal failure and literature review. *J Med Toxicol* 2009; 5 (1): 32-8.
87. Apperley S, Kroeger P, Kirchmair M, Kiaii M, Holmes DT, Garber I. Laboratory confirmation of *Amanita smithiana* mushroom poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 2013; 51 (4): 249-51.
88. Puschner B. Mushrooms. Chapter 62. En: *Small Animal Toxicology*. Peterson ME, Talcott PA, eds, Section 4: Specific toxicants, 3rd ed., Elsevier, 2013; pp. 659-76.
89. Gecan JS, Cichowicz SM. Toxic mushroom contamination of wild mushrooms in commercial distribution. *J Food Protection* 1993; 56 (8): 730-4.
90. Michelot D, Toth B. Poisoning by *Gyromitra esculenta* - a review. *J Appl Toxicol* 1991; 11 (4): 235-43.
91. Kalač P. Detrimental Compounds and Effects. Chapter 5. En: *Edible Mushrooms: Chemical Composition and Nutritional Value*. Technology and Engineering, Academic Press, 2016; 155-80.
92. Horowitz KM, Horowitz BZ. Toxicity, Mushroom, *Gyromitra*. StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2017.
93. Wright AV, Niskanen A, Pyysalo H, Korpela H. The toxicity of some *N*-methyl-*N*-formylhydrazones from *Gyromitra esculenta* and related compounds in mouse and microbial tests. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 45 (2): 429-34.
94. Peredy TR. Mushrooms, monomethylhydrazine (MMH) – generating. En: *Encyclopedia of Toxicology*. Wexler P. (ed.), 3a ed., Elsevier, 2014; pp. 414-5.
95. Hall IR. *Edible and Poisonous Mushrooms of the World*. Portland, Oregon: Timber Press, 2003.
96. Sept JD. *Common Mushrooms of the Northwest: Alaska, Western Canada & the Northwestern United States*. Sechelt, British Columbia: Calypso Publishing, 2006; p. 82.
97. Arshadi M, Nilsson C, Magnusson B. Gas chromatography-mass spectrometry determination of the pentafluorobenzoyl derivative of methylhydrazine in false morel (*Gyromitra esculenta*) as a monitor for the content of the toxin gyromitrin. *J Chromatogr A* 2006; 1125 (2): 229-33.
98. Beug MW. NAMA Toxicology Committee Report for 2008: Recent Mushroom Poisonings in North America. *McIlvainea* 2009; 18: 45-54.
99. Barceloux DG. False Morel and Gyromitrin Poisoning. Chapter 38. En: *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*. Wiley, 2008; pp. 285-9.
100. IARC. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Agents classified by the IARC Monographs*, 2012; Vols 1-105: 1-33.
101. Hossain A, Park S. A review on mushroom toxins. Chapter 14. En: *Food Toxicology*. Bagchi D, Swaroop A (eds), CRC Press, Boca Raton, 2016; pp. 275-302.
102. Leathem AM, Dorran TJ. Poisoning due to raw *Gyromitra esculenta* (false morels) west of the Rockies. *Can J Emerg Med* 2007; 9 (2): 127-30.
103. Du X-H, Zhao Q, Yang ZL. A review on research advances, issues, and perspectives of morels. *Mycology* 2015; 6 (2): 78-85.

104. Saviuc P, Harry P, Pulce C, Garnier R, Cochet A. Can morels (*Morchella* sp.) induce a toxic neurological syndrome? *Clin Toxicol (Phila)* 2010; 48 (4): 365-72.
105. Pfab R, Haberl B, Kleber J, Zilker T. Cerebellar effects after consumption of edible morels (*Morchella conica*, *Morchella esculenta*). *Clin Toxicol(Phila)* 2008; 46 (3): 259-60.
106. Nothnagel P. Gesundheitliche Störungen nach Morchelgenuß. *Mykologisches Mittelungsblatt*, Halle/S 6, 1962: 32-3.
107. Beug MW, Shaw M, Cochran KW. Thirty-plus years of mushroom poisoning: summary of the approximately 2,000 reports in the NAMA Case Registry. *McIlvainea* 2006; 16 (2): 47-68.
108. Flammer RJ, Schenk-Jäger M. Pilzvergiftung – die Schattenseiten des Myzetismus. *Therapeutische Umschau* 2009; 66: 357-64.
109. Benjamin DR. Neurological effects of *Mochella* sp. [http://www.fungimag.com/fall-2015-articles/LR%20Morcella24\\_25.pdf](http://www.fungimag.com/fall-2015-articles/LR%20Morcella24_25.pdf). Fecha de acceso: 6 julio 2018.
110. Roody WC. *Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians*. University Press of Kentucky, 2015.
111. Lo Y-C, Lin S-Y, Ulzijiargal E, Chen S-Y, Chien R-C, Tzou Y-J, et al. Comparative study of contents of several bioactive components in fruiting bodies and mycella of culinary-medicinal mushrooms. *Int J Med Mushrooms* 2012; 14: 357-63.
112. Lin S-Y, Chen Y-K, Yu H-T, Barseghyan GS, Asatiani MD, Wasser SD, et al. Comparative study of contents of several bioactive components in fruiting bodies and mycelia of culinary-medicinal mushrooms. *Int J Med Mushrooms* 2013; 15: 313-27.
113. Gunde-Cimerman N, Cimerman A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Exp Mycol* 1995; 19 (1): 1-6.
114. Floyd JS, Heckbert SR, Weiss NS, Carrell DS, Psaty BM. Use of administrative data to estimate the incidence of statin-related rhabdomyolysis. *J Am Med Assoc* 2012; 307: 1580-2.
115. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Controlling Cholesterol with Statins. Updated: February 16, 2017.* <https://www.fda.gov/forconsumers/consumerupdates/ucm293330.htm>. Fecha de acceso: 6 julio 2018.
116. Mevacor, Altoprev (lovastatin) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. *Medscape Reference.* <https://reference.medscape.com/drug/mevacor-altoprev-lovastatin-342458>. Fecha de acceso: 6 julio 2018.
117. Piecha M, Sarakha M, Trebse P, Kocar D. Stability studies of cholesterol lowering statin drugs in aqueous samples using HPLC and LC-MS. *Environ Chem Lett* 2010; 8: 185-91.
118. Ulzijiargal E, Yang J-H, Lin L-Y, Chen C-P, Mau J-L. Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food Chem* 2013; 138: 70-6.
119. Markova NG, Karaman-Jurukovska N, Dong KK, Damaghi N, Smiles KA, Yarosh DB. Skin cells and tissue are capable of using *L*-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med* 2009; 46 (8): 1168-76.
120. Cheah I K, Halliwell B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822 (5): 784-93.
121. Koepsell H. Organic Cation and Zwitterion Transporters (OCTs, OCTNs). En: You G, Morris ME (editores). *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. Chapter 2, Wiley Online Library, Second Edition, 2014; pp. 7-24.

122. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck D, Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, et al. *Statement on the safety of synthetic L-ergothioneine as a novel food – supplementary dietary exposure and safety assessment for infants and young children, pregnant and breastfeeding women. EFSA J* 2017; 15 (11): 5060.
123. Kreisel H. Liste der ethnomykologisch und biotechnologisch relevanten Pilze. *Feddes Repertorium* 2005; 166 (5-6): 339-91.
124. Du X-H, Zhao Q, O'Donnell K, Rooney AP, Yang ZL. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China. *Fungal Genet Biol* 2012; 49 (6): 455-69.
125. Barseghyan GS, Wasser SP. Species diversity of the genera *Morchella* St. Amans and *Helvella* L. ex St. Amans (Ascomycota, Pezizales) in Israeli mycobiota. *Nova Hedwigia* 2008; 87 (3-4): 315-36.
126. Faris HA, Broderick A, Nair NG. Occurrence and Initial Observations of *Morchella* in Australia. En: Royse DJ, editor. Proc. 2nd Int. Conf. - *World Society of Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania State University, EE.UU. 1996; pp 393-9.
127. Kuo M, Dewsbury DR, O'Donnell K, Carter MC, Rehner SA, Moore JD, et al. Taxonomic revision of true morels (*Morchella*) in Canada and the United States. *Mycologia* 2012; 104 (5): 1159-77.
128. Pinzón-Osorio CA, Pinzón-Osorio J. Primer registro de la familia Morchellaceae (Ascomycota: Pezizales) para Colombia. *Rev Peru Biol* 2017; 24 (1): 105-10.
129. Gamundí IJ, Minter DW, Romero AI, Barrera VA, Gaiotti AL, Messuti MI, Stecconi M. Checklist of the Discomycetes (Fungi) of Patagonia, Tierra del Fuego and adjacent Antarctic areas. *Darwiniana* 2004; 42 (1-2): 63-164.
130. Cortez GV, Coelho G, Guerrero TR. *Morchella esculenta* (Ascomycota): uma rara espécie encontrada em Santa Maria, Rio grande do sul, Brasil. *Biociências* 2004; 12: 51-3.
131. Richard F, Bellanger J-M, Clowez P, Hansen K, O'Donnell K, Urban A, Sauve M, Courtecuisse R, Moreau P-A. True morels (*Morchella*, Pezizales) of Europe and North America: evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy. *Mycologia* 2015; 107 (2): 359-82.
132. Wipf D, Fribourg A, Munch JC, Botton B, Buscot F. Diversity of the internal transcribed spacer of rDNA in morels. *Can J Microbiol* 1999; 45 (9): 769-78.
133. O'Donnell K, Rooney AP, Mills GL, Kuo M, Weber NS, Rehner SA. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genet Biol* 2011; 48 (3): 252-65.
134. Voitk A, Beug MW, O'Donnell K, Burzynski M. Two new species of true morels from Newfoundland and Labrador: cosmopolitan *Morchella eohespera* and parochial *M. laurentiana*. *Mycologia* 2016; 108 (1): 31-7.
135. Pildain MB, Visnovsky SB, Barroetaveña C. Phylogenetic diversity of true Morels (*Morchella*), the main edible non-timber product from native Patagonian forests of Argentina. *Fungal Biol* 2014; 118 (9-10): 755-63.
136. Kraft J, Bauer S, Keilhoff G, Miersch J, Wend D, Riemann D, et al. Biological effects of the dihydroorotate dehydrogenase inhibitor polyporic acid, a toxic constituent of the mushroom *Haplophilus rutilans*, in rats and humans. *Arch Toxicol* 1998; 72 (11): 711-21.

137. Villa AF, Saviuc P, Langrand J, Favre G, Chataignerl D, Garnier R. Tender nesting polypore (*Hapalopilus rutilans*) poisoning: report of two cases. *Clin Toxicol (Phila)* 2013; 51 (8): 798-800.
138. Azzolina R, La Camera G, Fiorino LS, Chiarenza F, Di Francesco A, Cavaleri M, Navarra DV, Celestri M, Coco MO. Mushroom poisoning. *Acta Med Mediterranea* 2011; 27: 121-4.
139. Cali V, Spatafora C, Tringali C. Polyhydroxy-p-terphenyls and related p-terphenylquinones from fungi: overview and biological properties. *Studies in Natural Products Chemistry* 2003; 29: 263-307.
140. Cohen PA, Robinson PD. 2,5-diphenyl-3,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone (polyporic acid). *Acta Crystallogr* 2001; E57: o596-8
141. Brewer D, Jen WC, Jones GA, Taylor A. The antibacterial activity of some naturally occurring 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinones. *Can J Microbiol* 1984; 30(8): 1068-92.
142. Schüffler A, Liermann JC, Opatz T, Anke T. Elucidation of the biosynthesis and degradation of allantofuranone by isotopic labelling and fermentation of modified precursors. *Chembiochem* 2011; 12 (1): 148-54.
143. Diaz JH. Amatoxin-containing mushroom poisonings: species, toxidromes, treatments, and outcomes. *Wilderness EnvironMed* 2018; 29 (1): 111-8.
144. Ventura S., Ruiz C., Durán E., Mosquera M., Bandrés F., Campos F., et al. Amanitinas. *Revista del Laboratorio Clínico* 2015; 8(3): 109-26.
145. Zilker T., Faulstich H. Cyclopeptide-Containing Mushrooms: The Deadly *Amanitas*. En: Brent J., Burkhart K., Dargan P., Hatten B., Megarbane B., Palmer R. (eds), *Critical Care Toxicology*. Springer, Cham, 2017; 2129-48.
146. Lauga A, Perel C, D'Ortencio AO. Balón de contrapulsación intraaórtico. *Rev Insuf Cardíaca* 2008; 3 (4): 184-95.
147. Nielsen DS, Shepherd NE, Xu W, Lucke AJ, Stoermer MJ, Fairlie DP. Orally absorbed cyclic peptides. *Chem. Rev* 2017; 117 (12): 8094-128.
148. Jander S, Bischoff J, Woodcock BG. Plasmapheresis in the treatment of *Amanita phalloides* poisoning: II. A review and recommendations. *Ther Apher* 2000; 4 (4): 308-12.
149. Faybik P, Hetz H, Baker A, Bittermann C, Berlakovich G, Werba A, et al. Extracorporeal albumin dialysis in patients with *Amanita phalloides* poisoning. *Liver Int* 2003; 23 (Suppl 3): 28-33.
150. Christmann H. Prometheus® – ein extrakorporales Blutreinigungsverfahren zur Leberunterstützung. *Kardiotechnik* 2006; 4: 108-11.
151. Vardar R, Gunsar F, Ersoz G, Akarca US, Karasu Z. Efficacy of fractionated plasma separation and adsorption system (Prometheus) for treatment of liver failure due to mushroom poisoning. *Hepatogastroenterology* 2010; 57 (99-100): 573-7.
152. Bergis D, Friedrich-Rust M, Zeuzem S, Betz C, Sarrazin C, Bojunga J. Treatment of *Amanita phalloides* intoxication by fractionated plasma separation and adsorption (Prometheus®). *J Gastrointestin Liver Dis* 2012; 21 (2): 171-6.
153. Stankiewicz R, Lewandowski Z, Kotulski M, Patkowski W, Krawczyk M. Effectiveness of fractionated plasma separation and adsorption as a treatment for *Amanita phalloides* poisoning. *Ann Transplant* 2016; 21: 428-32.
154. Wittebole X, Hantson P. Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS™) for the management of acute poisoning with or without liver failure. *Clin Toxicol (Phila)* 2011; 49 (9): 782-93.



155. Méndez-Navarro J, Ortiz-Olvera NX, Villegas-Ríos M, Méndez-Tovar LJ, Andersson KL, Moreno-Alcantar R, et al. Hepatotoxicity from ingestion of wild mushrooms of the genus *Amanita* section *Phalloideae* collected in Mexico City: two case reports. *Ann Hepatol* 2011; 10 (4): 568-74.
156. Pillukat MH, Schomacher T, Baier P, Gabriëls G, Pavenstädt H, Schmidt HH. Early initiation of MARS® dialysis in *Amanita phalloides*-induced acute liver injury prevents liver transplantation. *Ann Hepatol* 2016; 15 (5): 775-87.
157. Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Gomulkiwicz A, Szelag A, Dziegciel P. Comparative antidotal efficacy of benzylpenicillin, ceftazidime and rifamycin in cultured human hepatocytes intoxicated with *alpha*-amanitin. *Arch Toxicol* 2009; 83 (12): 1091-6.
158. Magdalan J, Piotrowska A, Gomulkiwicz A, Sozański T, Podhorska-Okolów M, Szelag A, et al. Benzylpenicyllin and acetylcysteine protection from  $\alpha$ -amanitin-induced apoptosis in human hepatocyte cultures. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63 (4): 311-5.
159. Mengs U, Pohl RT, Mitchell T. Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13 (10): 1964-70.
160. Lacombe G, St-Onge M. Towards evidence-based emergency medicine: best BETs from the Manchester Royal Infirmary. BET 1: Silibinin in suspected amatoxin-containing mushroom poisoning. *Emerg Med J* 2016; 33 (1): 76-7.
161. Ganzert M, Felgenhauer N, Schuster T, Eyer F, Gourdin C, Zilker T. [*Amanita* poisoning--comparison of silibinin with a combination of silibinin and penicillin]. (Artículo en idioma alemán). *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133 (44): 2261-7.
162. Garcia J, Carvalho AT, Dourado DF, Baptista P, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. New *in silico* insights into the inhibition of RNAP II by  $\alpha$ -amanitin and the protective effect mediated by effective antidotes. *J Mol Graph Model* 2014; 51: 120-7.
163. Garcia J, Costa VM, Carvalho AT, Silvestre R, Duarte JA, Dourado DF, et al. A breakthrough on *Amanita phalloides* poisoning: an effective antidotal effect by polymyxin B. *Arch Toxicol* 2015; 89 (12): 2305-23.
164. Magdalan J, Piotrowska A, Gomulkiwicz A, Sozański T, Szelag A, Dziegciel P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with *alpha*-amatoxin. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30 (1): 38-43.
165. Muszyńska K, Ostrowska D, Bartnicki F, Kowalska E, Bodaszewska-Lubaś M, Hermanowicz P, et al. Selection and analysis of a DNA aptamer binding  $\alpha$ -amanitin from *Amanita phalloides*. *Acta Biochim Pol* 2017; 64 (3): 401-6.
166. Vo KT, Montgomery ME, Mitchell ST, Scheerlinck PH, Colby DK, Meier KH, et al. *Amanita phalloides* mushroom poisonings — Northern California, December 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66 (21): 549-53.
167. Lheureux P, Penalzoza A, Gris M. Pyridoxine in clinical toxicology: a review. *Eur J Emerg Med* 2005; 12 (2): 78-85.
168. Zuberbuhler P, Young P, León Cejas LV, Finn BC, Bruetman JE, Calandra CR, et al. Neuronopatía sensitiva: Su reconocimiento y tratamiento temprano. *Medicina (Buenos Aires)* 2015; 75 (5): 297-302.

169. Aminoff MJ, Albers JW. Electrophysiologic techniques in the evaluation of patients with suspected neurotoxic disorders. Chapter 36. En: Aminoff MJ, editor. *Aminoff's Electrodiagnosis in Clinical Neurology. Section VII: Electrophysiologic Evaluation in Special Situations*. 6<sup>th</sup> ed., 2012; pp. 813-30.
170. Brandão JL, Pinheiro J, Pinho D, Correia Da Silva D, Fernandes E, Fragoso G, et al. Intoxicação por cogumelos em Portugal. *Acta Med Port* 2011; 24 (S2): 269-78.

+++++\*\*\*\*\*+++++

## LA IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS RECEPTORES TOLL

Santiago R. Rodríguez, Krikor Mouchián, Ángel Alonso.-

Div. Alergia.- Htal. de Clínicas.- 2<sup>da</sup> Cátedra de Microbiología. UBA.-SCA. ANCB.A.-

**Resúmen** : se exponen la importancia, estructura y fisiopatología de los receptores Toll en la microbiología, inmunología, alergia y medicina interna, a la luz de los nuevos conocimientos. Su trascendencia en la llamada inmunidad innata o connatural es resaltada al igual que las vías de señalización que utilizan para la activación de células inmunocompetentes, sus citoquinas y quimioquinas.

**Palabras clave:** receptores Toll ; estructura y fisiopatología; microbiología; inmunología; alergia; citoquinas; quimioquinas.

**Summary:** the importance of the Toll receptors, their structure and physiopathology in microbiology, immunology, allergy and internal medicine is emphasized. They play an important role in the activation of immune cells and the production of several cytokines and chemokines.

**Key words:** Toll receptors; microbiology, immunology, allergy, internal medicine, cytokines, chemokines.

### Introducción.

La historia de los receptores Toll (TLR), comienza en 1988 con el descubrimiento de las particularidades citoplasmáticas del receptor de la IL-1. Luego, se comprueba que una proteína denominada Toll, de la mosca *Drosophila melanogaster*, presentaba una región citoplasmática similar a la del receptor humano de la IL-1. En 1996, se descubre la función protectora de la proteína Toll en dichas moscas, al observar que actúa en la defensa contra las infecciones fúngicas. Desde entonces, se identificaron receptores similares que intervienen en la respuesta anti-infecciosa en las plantas, los insectos y los vertebrados, y que se denominan TLRs. En el hombre, aparecen los primeros TLR en el año 1997, y hasta hoy, se han identificado 15 en total, 10 de ellos en el hombre. Su importancia en la respuesta innata frente a los patógenos radica en que generan señales, capaces de estimular tanto la producción de péptidos anti-microbianos como de dirigir la respuesta adaptativa posterior. La localización celular varía según el TLR. Los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se expresan en la superficie celular y migran a los fagosomas tras activarse al reconocer al ligando, y los TLRs 3, 7, 8 y 9 se expresan en compartimentos intracelulares, principalmente en endosomas y retículo endoplásmico, con los dominios de unión a los ligandos orientados hacia el lumen. Cada TLR reconoce a un grupo de moléculas distinto. Los TLRs expresados en la membrana celular reconocen moléculas como los lipopolisacáridos (LPS) y los lipopéptidos indicando la presencia de patógenos como bacterias, protozoos y hongos mientras que los TLRs expresados en los compartimentos intracelulares reconocen ácidos nucleicos detectando así la infección intracelular por virus. La unión del ligando al TLR provoca un cambio conformacional que origina una cascada de señalización intracelular finalizando en la producción de mediadores de la inflamación o promoviendo la diferenciación, la proliferación o la apoptosis de la célula. La ruta de señalización intracelular es característica para cada tipo de TLR produciéndose una respuesta diferencial en la célula según el TLR estimulado. Así, los

TLRs detectan la presencia y el tipo de patógeno y generan una respuesta inmediata contra el mismo. (1,-2,-3,-4). La detección y el reconocimiento del patógeno son llevados a cabo por células como las dendríticas (CDs) y los macrófagos que patrullan al organismo, y, conlleva a una rápida producción de citoquinas y quimioquinas. Las señales originadas por los TLRs promueven la expresión de moléculas de adhesión tanto en las células epiteliales como en las células hematopoyéticas circulantes promoviendo su llegada a la zona de la infección. La respuesta innata a un patógeno es decisiva en la regulación de la respuesta adaptativa. Las células presentadoras del antígeno (CPA), especialmente las CDs, constituyen la interfaz entre ambos tipos de respuesta. Los ligandos para los TLR provocan que éstas maduren convirtiéndose en CPA activas por la expresión de moléculas coestimuladoras (el CD40, el CD80 y el CD86) necesarias para la activación de los LT. Las citoquinas inducidas por TLRs guían la diferenciación de los LT a LT helper CD4+, en concreto a Th1, o a LT citotóxicos CD8+. (5,-6,-7,-8).

### **Células que expresan los TLR.**

**Monocitos y Macrófagos:** ambos expresan ARNm para la mayoría de los TLR, con excepción del TLR3.

**CDs:** la expresión de TLR difiere según su origen; así, en el hombre, pueden ser de estirpe mieloide o plasmacitoide. Las primeras expresan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR8, mientras que las segundas, exclusivamente TLR7 y TLR9. Algunos autores sugieren que el TLR7 se expresaría en las de origen mieloide. Ambas maduran en respuesta a los componentes microbianos y la expresión del TLR difiere según el patrón de maduración. La mayoría de los tejidos expresa al menos un TLR; aunque los fagocitos son las células con mayor expresión de TLR, algunas moléculas se expresan preferentemente en los LB.

**Células cebadas o mastocitos:** están muy preservadas a lo largo de la evolución, y pueden fagocitar patógenos, procesar antígenos y producir citoquinas, lo cual las involucra en la respuesta inmune innata además de participar en las reacciones alérgicas. Expresan TLR2, TLR4, TLR6 y TLR8, pero no TLR5. La inyección intradérmica de peptidoglicano causa su activación en la piel a través del TLR2, y podría intervenir en las lesiones de la dermatitis atópica (DA).

Las mucosas intestinal y respiratoria poseen una capa simple de células epiteliales que forma una barrera contra los patógenos. En el intestino, la cara apical de las células epiteliales está expuesta a las bacterias sin que se genere inflamación, que solamente ocurre cuando los gérmenes patógenos invaden el compartimiento basolateral. El TLR5 se expresa en esta última cara, mientras que el TLR4 sólo se expresa en las células epiteliales del intestino, lo cual explica la baja reacción a LPS. Por su parte, el epitelio intestinal de pacientes con enfermedades inflamatorias tiene mayor expresión del TLR4, lo que sugiere que estos enfermos tienen una respuesta exagerada a la flora bacteriana intestinal. En el epitelio, la expresión del TLR está sujeta a una regulación exquisita de manera tal que sólo haya respuesta frente a gérmenes patógenos y no comensales. La expresión del TLR4 en el aparato de Golgi es importante para la producción de quimioquinas inducidas por el LPS. Las células epiteliales del riñón son una barrera importante contra la pielonefritis por gérmenes Gram-negativos. El INF- $\gamma$  y el TNF $\alpha$  inducen la expresión de los TLR2 y TLR4 y contribuyen así en la detección de la invasión bacteriana en la luz tubular. El TLR4 tiene un papel en la detección de la infección del epitelio pulmonar por H. influenzae, y también se expresa en el epitelio de la córnea. El Mycobacterium avium induce mayor expresión del ARNm del LTR2 y menos expresión del TLR4. El factor estimulante de colonias 1 se

sintetiza luego de la inyección de LPS y prepara a los macrófagos para que liberen más citoquinas; también reduce la expresión del TLR9 en ellos y suprime la producción de citoquinas inducida por el ADN CpG. El MIF regula la expresión del TLR4. El INF- $\gamma$  aumenta la expresión del TLR4 en macrófagos y monocitos humanos. La IL-15, que promueve el desarrollo extratímico y la supervivencia de LTCD8+ y células NKC, induce la expresión del gen del TLR2. (9,-10,-11,-12,-13,-14,-15).

**Estructura de los TLRs:** son proteínas transmembrana tipo I, que contienen un dominio intracelular y otro extracelular. El extremo carboxilo-terminal (citósico), o dominio intracelular contiene homología con los receptores para la IL-1, o región conservada que se denomina TIR (Toll-IL-1R), compuesto por 3 regiones homólogas, llamadas box 1, 2 y 3. El TIR se asocia a proteínas adaptadoras por su homología, como es la proteína MyD 88 (proteína 88 de diferenciación mieloide), que media la traducción de señales. Los dominios extracelulares difieren de los de la IL-1, por un extremo amino terminal (externo) con repeticiones en tandem de leucina conocidas como LRR, cuya función es la unión al ligando, dimerizar y poseer una estructura muy conservada entre insectos y humanos. Los genes *tlr* que codifican a sus respectivas proteínas se localizan en los cromosomas 4p14 (TLR1), 4q32 (TLR2), 4q35 (TLR3) 9q32-33 (TLR4), 1q33.3 (TLR5), 4p16.1 (TLR 6), Xp22.3 (TLR7), y 3p21.3 (TLR9).

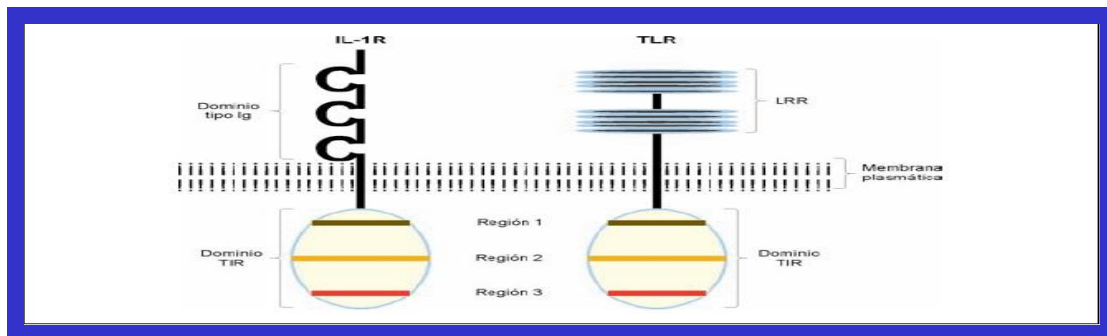


Fig. 1: Se destacan las diferencias y similitudes entre el TLR y el IL-1R.

### Descripción de los diferentes TLRs:

**TLR1:** se halla en la membrana plasmática y reconoce peptidoglicanos (PGN) y lipoproteínas de bacterias. Se asocia con el TLR2 y tiene homología con el TLR6, pero con el TLR4 inhiben la señalización en las células endoteliales, y podría tener una función más importante de regulación por la interacción con diferentes TLRs.

**TLR2:** localizado en la membrana plasmática reconoce componentes de virus, hongos, micoplasmas y bacterias como los lipoarabinomanano, PGN, glicolípidos y glicofosfatidilinositoles. No actúa como monomérico, sino con interacciones heterodiméricas con los TLR1 o TLR6. El complejo TLR2/TLR6 no se activa por lipoproteínas triacetiladas, y si por lipoproteínas diacetiladas, mientras que el complejo TLR2/TLR1 es activado por lipoproteínas triacetiladas, pero no diacetiladas.

**TLR3:** es endosomal y reconoce ARN vírico de doble cadena, que es un potente inductor del INF- $\alpha$  e INF- $\beta$  ejerciendo un efecto antiviral e inmunoestimulador a través de la maduración de las CDs. Posee el patrón de expresión más restringido y se localiza en los endosomas de las CDs inmaduras.

**TLR4:** se halla en la membrana plasmática y reconoce LPS bacterianos, formado por un

núcleo de oligosacáridos, una cadena O específica, con secuencias repetidas de polisacáridos hidrofílicos, y un dominio hidrofóbico o lípido A, responsable de la actividad biológica. El reconocimiento de LPS y la señalización por TLR4 requiere de 2 coreceptores, MD2 (factor mielóide de diferenciación 2) y CD14. MD2, está en la superficie celular asociado al dominio extracelular del TLR4. Además, reconoce al Taxol, un diterpeno purificado de la corteza de *Taxus brevifolia*. El TLR4 reconoce ligandos endógenos, como las proteínas del estrés térmico (HSP60 y HSP70), el dominio extracelular A de la fibronectina, oligosacáridos del ácido hialurónico, heparan sulfato y fibrinógeno. Se requieren altas concentraciones de estas moléculas para activarlo.

**TLR5:** reconoce a la flagelina y se expresa en la parte basolateral de las células epiteliales del intestino, y produce citoquinas inflamatorias en las células epiteliales del pulmón, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la presentación antigénica. Es el único que se une directamente al producto que detecta.

**TLR6:** se encuentra en la membrana plasmática y reconoce lipoproteínas diacetiladas de las bacterias y los virus.

**TLR7:** es endosomal y reconoce ARNs de los virus, las bacterias y los ácidos nucleicos de los patógenos endógenos y compuestos sintéticos como la imidazoquinolina. El murino reconoce compuestos como la loxorribina, la cual tiene actividades antivirales y anti-tumorales.

**TLR8:** pertenece a la subfamilia del TLR9 y junto con el TLR7 reconocen al ARNs viral y del propio hospedero; se expresa en el endosoma su dominio de reconocimiento del ligando y el TIR en el citoplasma.

**TLR9:** reconoce a los ácidos nucleicos de las bacterias, los virus, de los patógenos endógenos y las secuencias CpG no metiladas del ADN bacteriano, que es un potente inductor de la IL-12 y del TNF- $\alpha$ , que polarizan la respuesta inmune a Th1. La unión se hace en el endosoma, a diferencias de los TLR1, 2 y 4, que lo hacen en la superficie celular. En los ratones, el reconocimiento del citomegalovirus en las CDs es dependiente del TLR9, que se localiza en el retículo endoplásmico antes de ser estimulado. Los herpes simplex 1 y 2 también activan a este receptor.

**TLR10:** es endosomal y es el último descubierto, desconociéndose su ligando.

**TLR11:** identificado en los ratones, se expresa en las células epiteliales urinarias regulando la resistencia a las infecciones por las bacterias uropatógenas. El ligando específico no se ha identificado. Responde a la profilina del *Toxoplasma gondii*.

**TLR12, -TLR13, -TLR14:** se localizan en la superficie de las membranas, y sus ligandos sólo se reconocen en las células murinas.

**TLR15:** es el más novel de la familia TLR, y se asocia con el reconocimiento de los componentes de *Salmonella* spp. (16,-17,-18,-19,-20).

### **Cascada de señalización.**

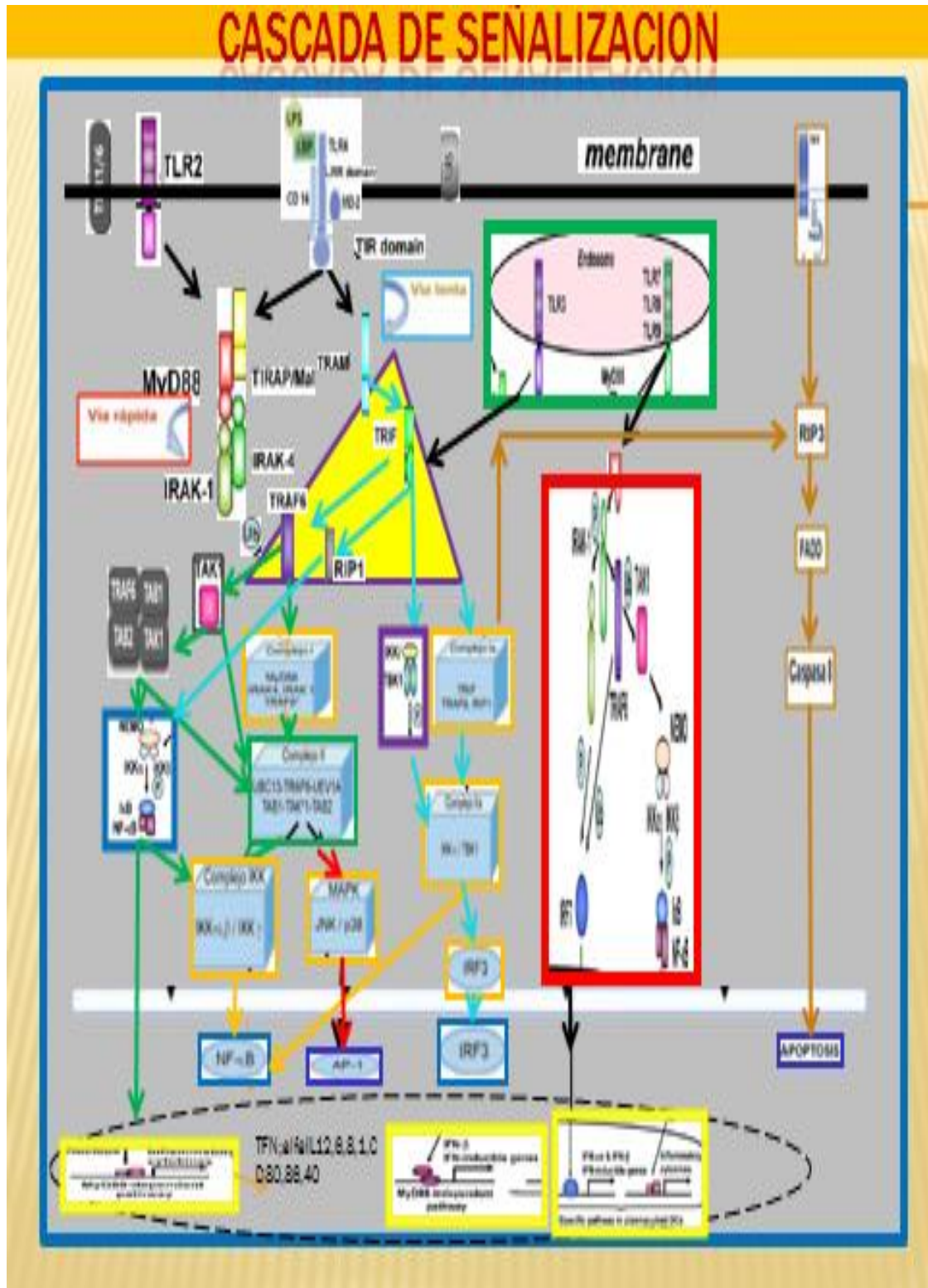
La unión de los TLRs con sus ligandos causa dimerización de los receptores, y, la porción citoplasmática se une a diferentes moléculas adaptadoras a través de su dominio TIR, el cual posee 4 adaptadores MYD 88, TIRAP/MAL, TRIF y TRAM, dependiendo su activación del tipo de TLR. El cambio conformacional recluta las moléculas y efectúa la señalización. La MYD88, de 35 kDa presenta 3 dominios funcionales: un TIR en el carboxilo terminal por el cual se asocia al TLR, uno DD en el amino terminal que media la interacción con DD presentes en otras proteínas, y uno DI, el cual activa, a proteínas-quinasa asociadas al IL-1R

(IRAKs). La familia de las IRAKs está compuesta por 4 integrantes: IRAK-1, 2,4 y M, los cuales poseen un DD en el amino terminal y un dominio con actividad quinasa en la región central. Sólo IRAK-1 y 4 presentan actividad quinásica, ya que IRAK-2 y M inhiben la ruta de señalización de IL-1/TLR. El reclutamiento de MYD 88 con las IRAKs se pone en marcha a través del interruptor TIRAP/MAL, la vía independiente de MYD 88, y el otro adaptador TRAM. TRIF ó dominio adaptador de los inductores del IFN- $\beta$ , da la señal independiente, por lo tanto, la activación del MYD 88, recluta quinasas específicas IRAKs que ligan TRAF a un mediador de señal. Así, [MYD 88-IRAK-4 –IRAK-1 y TRAF 6] forman un complejo de adaptación donde TRAF 6 es continuador de la señal. La proximidad de las IRAKs hace que IRAK-4 fosforile a IRAK-1 y ésta fosforilada se une a TRAF 6. Este activado se separa del complejo, y acopla 2 ubiquitinas UEV1A (ubiquitina conjugada enzima E 2 –variante 1) y UBC13 ( ubiquitina conjugada enzima - 13), que conduce a la ubiquitinación de TRAF 6 y se une a 3 nuevos componentes y activan TAK-1 en el complejo II formado por [TRAF6-UV1A-UBC-13TAK-1-TAB-1-TAB-2]. TAK-1 es una quinasa activada del TGF- $\beta$  y TAB-1 y 2, proteínas de unión a TAK-1; las ubiquitinas son proteínas reguladoras de los eucariotas que se unen a otras proteínas para su destrucción en el proteasoma, que degrada y recicla proteínas innecesarias. Una vez formado el complejo II surgen 2 vías independientes de señalización una que lleva a la activación de las MAP-quinasas y otra que conduce a la activación del sistema NF- $\kappa$ B. En la primera, la activación de TAK-1 induce la fosforilación de las MAPKs quinasas (JUN/p38) promoviendo la translocación nuclear del factor AP1, que induce la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40; en la segunda ruta TAK-1 fosforila al complejo de quinasas IKKs, el cual está formado por 2 subunidades catalíticas IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , o IKK-1 y IKK-2 y una subunidad reguladora IKK $\gamma$ , o MEMO. El complejo IKK activado destruye el inhibidor del NF- $\kappa$ B, IKB, que mantiene a NF- $\kappa$ B inactivo, se fosforila y se degrada en el proteasoma permitiendo la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo para la expresión génica que codifica para las citoquinas y moléculas de adhesión, como el TNF $\alpha$  y las IL-12, IL-6, IL-8 e IL-1.

La segunda vía de señalización, o vía MYD 88 independiente, solo se emplea por los TLR3 y TLR4, y es una opción alternativa. Señalizan a través de TRIF y solo el TLR4 se une a TRAM. La vía independiente a MYD 88, tiene esta secuencia: la proteína acopladora TRIF, que activa el factor nuclear IRF3 en la expresión del gen que codifica al INF- $\beta$ , a la vez que los genes inducibles por INF, requieren IRF3 ,TRIF lo consigue en 2 pasos , en el primero el Ia TRIF se une a TRAF 6 y a RIP1, y, luego 2 proteínas relacionadas con IKK son las quinasas que fosforilan y activan al IRF3, estas proteínas que conforman el complejo IIa de la vía lenta son IKK $\epsilon$  (también inducible, IKKi) y TBK1 o NAK (activación de la quinasa NF- $\kappa$ B). La vía lenta favorece la apoptosis por RIP1 / RIP3 (adaptadores en la vía de señales del TNF), y desencadenan una fase de producción de moléculas proinflamatorias. La incapacidad para identificar un receptor del LPS fue una barrera para comprender como las bacterias Gram-negativas iniciaban la reacción inflamatoria. La activación de las células del organismo infectado depende de la presencia de una proteína libre, circulante, denominada proteína acopladora del LPS (LBP) y del receptor CD14. La LBP compite con lipoproteínas respecto al LPS; LPS ligado a lipoproteínas forma micelas inertes desde el punto de vista inflamatorio, pues no liberan citoquinas. La forma estable de CD14, acoplado en la membrana (mCD14), asegura su anclaje a la superficie celular mediante el glicosilfosfatidil-inositol. También se encuentra libre en la circulación, como CD soluble (sCD14). Muchas células que son CD14 negativas, como las dendríticas, los fibroblastos, las



musculares lisas o el endotelio vascular, responden al complejo [LBP-LPSsCD14]. El sCD14 del suero de individuos sanos se incrementa en pacientes con procesos inflamatorios. Ni sCD14 ni mCD14 incorporan un endodominio intracitoplasmático; es necesario un eslabón que conecte [LBP-LPS-CD14] con el interior celular. Los TLRs, reconocen los diferentes patrones moleculares; pero para que esto resulte en la activación del receptor que inicia la vía de señales, se requiere otra molécula accesoria: el correceptor MD-2, que asegura la correcta posición del receptor. Con ello queda completado el complejo inicial: [(LBP)-LPS-(CD14)] [TLR-MD-2]. La misión de LBP es llevar, con sCD14 o sin él, al LPS hasta el complejo receptor, y la de CD14 es presentar el LPS al TLR. **(Fig. 1 y 2).**



**Fig. 2:** Consecuencias de la estimulación de los TLR: gracias a los factores de transcripción activados por las vías de señalización mediadas por los TLR, se favorece la transcripción de moléculas blanco, importantes para la generación y mantenimiento de la respuesta inmune. La activación del NF-κB, es clave pues regula la transcripción de los genes de las IL-1, IL-

2, IL-6, IL-12, el TNF $\alpha$ , el GM-CSF, ciertas quimioquinas, las moléculas de adhesión (ICAM, VACAM, ELAM), las proteínas de fase aguda, las moléculas del CMH y los Péptidos Naturales Antimicrobianos (PNA).

### **Agonistas y antagonistas.**

La diferente expresión de los TLRs en las CPA y su distribución en el organismo explican la complejidad de las respuestas connatural y adaptativa. Ello supone oportunidades para desarrollar nuevas vacunas y fármacos.

Los fármacos que actúan sobre los TLRs se usan como ligandos agonistas y antagonistas. Los primeros se unen a los TLRs generando una respuesta celular, mientras que los segundos, al unirse no la provocan e impiden la unión de los ligandos naturales agonistas. Se estudian agonistas de los TLRs, como adyuvantes en vacunas, en terapias antimicrobianas, en las alergias y en el cáncer.

**Agonistas como adyuvantes en vacunas:** se aprobaron 2 vacunas para el HBsAg que emplean el TLR4 como adyuvante. Estudios preclínicos demuestran que agonistas de los TLR 3, 4, 7 y 8, pueden potenciar vacunas para el cáncer e infecciones víricas crónicas como el HIV.

**Agonistas en la terapia de alergias:** una función desmedida de los LTCD4-Th2 es característica de las alergias. Agonistas de los TLR4 y TLR9 activan la respuesta Th1 que tiende a inhibir a los Th2. Se estudian tratamientos con los TLR4 y TLR9 para el asma y la rinitis alérgica.

**Agonistas en el tratamiento contra el cáncer:** activarían a las NKC, los macrófagos y los monocitos que reconocerían a las células tumorales y las destruirían, liberando antígenos que estimulen a los LTCD4- Th1 y LTCD8+. Otra estrategia es la apoptosis de las células tumorales que expresen TLRs. In vitro, esto se logró con células de la leucemia linfocítica crónica TLR9 positivas y en las células del carcinoma de mama que expresaban TLR3.

**Agonistas en terapias antimicrobianas.** los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se estudian para tratar enfermedades virales, por la síntesis de INFs de tipo I y la activación de la citotoxicidad por las NKC y los LTCD8+. El TLR7 es el más estudiado, y el “imiquimod” fue aprobado contra el virus del papiloma humano. (21,-22,-23,-24,-25).

Por otro lado, se desarrollan investigaciones en el uso de antagonistas de los TLRs, comenzando con agonistas estructurales que se unen al receptor, pero que no activan a la célula, con anticuerpos específicos para los TLRs, y con moléculas antagonistas escogidas de una biblioteca de compuestos, para tratar las enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas. Antagonistas del TLR4 para las sepsis inhibirían el reconocimiento de los LPS por el TLR4 evitando la respuesta inflamatoria. Se analizan antagonistas de los TLRs para evitar el descenso de los LTCD4 por el HIV, y se conocen ligandos endógenos para los TLRs humanos salvo para el TLR5 y el TLR10, procedentes de tejidos dañados o células en apoptosis. Altos niveles de estos ligandos podrían crónicamente ser adyuvantes y estimular a los LB y LT autorreactivos causando inflamaciones sin patógenos, o estériles. Pacientes con LES tienen leucocitos con altos niveles de INF- $\alpha$  y de genes activados por él. El exceso de INF- $\alpha$  está producido por las CD plasmocitoides, y se lleva cabo por los TLR7 o el TLR9, durante infecciones virales que agravan la enfermedad. Oligonucleótidos sintéticos antagonistas de los TLR7 y TLR9 son activos en modelos animales de esta enfermedad. El TLR7 sería un blanco terapéutico para las enfermedades autoinmunes una vez que mitigaron los efectos autoinmunes en los riñones y los pulmones de ratones MLR/lpr al inyectarlos con oligodeoxinucleótidos sintéticos con secuencias inmunorreguladoras dirigidas al TLR7 (IRS61); estos ratones redujeron los niveles séricos de la IL12-p40, anti-ANA de doble

cadena, la IgG2a, la IgG2b, y la IgG anti-Sm. El gen de la respuesta primaria de MyD 88, fue un blanco para el desarrollo de los tratamientos autoinmunes por su intervención en las cascadas de señalización de los TLR, a excepción del TLR3 un inhibidor de MyD88 que impide su dimerización. En experimentos in vivo del LES y de la esclerosis múltiple, se vio que el ST2825 interfería en el reclutamiento de la quinasa asociada al receptor de la IL-1 $\beta$  (IRAK 1), y 4 por MyD 88, bloqueando la cascada de señalización. Igualmente, se vio que el inhibidor suprimió la diferenciación de los LB en respuesta a la activación del TLR9 inducida por CpG. La IRAK 4, activa a los factores de translocación en las vías de señalización de los TLR, por lo cual amerita más estudios. La activación o regulación positiva de los inhibidores endógenos y el uso de inhibidores sintéticos de las vías de señalización de los TLR, podría mermar la producción de citoquinas y de autoanticuerpos. (26,-27).

Según Kawagoe , un atractivo para tratar la autoinmunidad es el inhibidor endógeno TANK (activador de NF- $\kappa$ B asociado a la familia TRAF), pues se demostró in vivo que esta proteína se comporta como un regulador negativo de la vía de señalización de los RTT impidiendo la desubiquitinación de TRAF-6, ocurrida en ratones TANK $^{-/-}$ , cuya cascada de señalización no se detuvo ni la inhibición de la translocación de NF- $\kappa$ B, luego de la estimulación de los TLR, a diferencia de los ratones TANK $^{+/+}$ . Por ello, los ratones TANK $^{-/-}$  tuvieron falla renal con complejos inmunes y autoanticuerpos. Otra molécula que inhibe la cascada de señalización de los TLR es el derivado de la oxazolidinona fumaril, (OSL07), que impidió la expresión de genes proinflamatorios in vitro, inhibió la dimerización del TLR4 y bloqueó moléculas adaptadoras, cuando se estimuló el receptor con LPS. Oliveira demostró que el virus de la fiebre porcina africana (VFPA), posee el gen ORF I329L, que codifica para la proteína I329L, la cual inhibe al NF- $\kappa$ B y al IRF3.

Patologías que involucran a los TLR: los estudios de polimorfismos en los genes que codifican los TLR o sus moléculas de señalización dilucidaron el papel de estos receptores en las enfermedades humanas.

**Sepsis:** es un síndrome por la infección sistémica de bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, por hongos o casos mixtos. En los humanos, el polimorfismo D299G en el gen del TLR4 es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de sepsis causado por bacterias Gram-negativas.

**Tuberculosis:** el polimorfismo R677W en el gen de TLR2 se asocia a lepra en la población coreana y con tuberculosis en la población Tunecina. Además el oligomorfismo R753Q en el mismo gen se considera protector durante la infección por *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*, ya que disminuye la señalización de los heterodímeros TLR2/TLR1.

**Ateroesclerosis:** la ateroesclerosis es un término genérico que engloba a enfermedades vasculares que presentan el engrosamiento y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales. La forma más frecuente es la ateroesclerosis, caracterizada por la formación de placas fibrosas en la íntima. El polimorfismo D299G en el gen del TLR4 se asocia con la reducción del riesgo de la aterosclerosis en las arterias carótidas y coronarias. Este polimorfismo se acompaña de una disminución de IL-6, fibrinógeno y VCAM-1, que son moléculas asociadas a la inflamación, a la progresión de la aterosclerosis, a la ruptura de placas y la oclusión de vasos. El descubrimiento de que la HSP60 de *Chlamydia pneumoniae* activa la señalización de TLR4 es importante, ya que la HSP60 se halló en lesiones de aterosclerosis, y al ser reconocida por el TLR4 puede exacerbar la inflamación mientras que el polimorfismo D299G la protegería.

**Estenosis aórtica degenerativa:** es una enfermedad lentamente progresiva que incluye en su fase inicial la esclerosis aórtica, y en fases más avanzadas la estenosis aórtica degenerativa. La válvula aórtica se estrecha o se produce su obstrucción gradual. El ventrículo izquierdo adapta la sobrecarga de la presión sistólica a través de su hipertrofia con el engrosamiento de su pared. La estenosis aórtica degenerativa en adultos es un proceso activo iniciado en parte por daño mecánico, y mediado por infiltración de lípidos o por una reacción inflamatoria crónica. Estudios histopatológicos demuestran que las válvulas aórticas degenerativas presentan células inflamatorias, macrófagos y LT. La activación del TLR2 modifica la acumulación de lipoproteínas en las células endoteliales y su expresión aumenta la hiperlipidemia mientras que las deficiencias del TLR2 reducen los cambios inducidos por la hiperlipidemia en el endotelio. La calcificación de las válvulas aórticas humanas está ligada a la expresión del TLR2, y apoya el papel de los TLRs en el proceso de calcificación. Oligomorfismos en el gen del TLR2 aumentan la susceptibilidad a desarrollar estenosis en nuestra población pues hay una relación entre ellos y el fenotipo. (28,-29,-30).

Fang demostró que los ratones inyectados con la proteína de unión al fotorreceptor retinoide para producir uveítis autoinmune experimental (UAE), más agonistas como coadyuvantes potenciaba la gravedad de la UAE. En dicho estudio se evaluó la función de los TLR2, 3, 4 y 9 mediante el uso de: lipopéptido triacilado sintético (pam3cys), ácido poliinosínico:policitidílico -análogo sintético del ARN de doble cadena- (poli I:C), LPS y los dinucleótidos CpG no metilados. La señalización entre los diferentes TLR y sus ligandos, fue potenciadora de la UAE. En la artritis reumatoide (AR) experimental, Joosten usó diferentes concentraciones de la pared celular estreptocócica, ligando de los TLR2 y TLR4, inyectadas en las articulaciones de los muridos. Con una inyección única, se produjo inflamación articular, pero con inyecciones repetidas se indujo artritis destructiva crónica. En este modelo, la señalización mediada por el TLR2 produjo la inflamación de la articulación, y que el TLR4 participó en la fase crónica con la destrucción del cartílago, y, la fase destructiva de la AR. Otros ratones con artritis inducida por el colágeno (AIC), luego de la inmunización con el tipo II, generó LT y autoanticuerpos contra esa proteína. Abdollahi usó este modelo e inyectó LPS viendo incremento de la artritis por los anticuerpos anticolágeno, pero que la inhibición del TLR4 eliminó clínica e histológicamente la AIC sin supresión de la respuesta adaptativa al colágeno. Otros demostraron que los ratones deficientes en la proteína RP105, homóloga del TLR4 y reguladora negativa de este receptor, tuvieron mayor gravedad de la AIC, dado que la señalización iniciada por el TLR4 sí participa en la fisiopatología de la artritis. La transferencia de suero de ratones con autoanticuerpos contra la enzima glucosa-6-fosfato-isomerasa, a ratones que no los producen, lleva a una artritis por los complejos inmunes de los autoanticuerpos en las articulaciones. La inyección de ligandos de los TLR2 y 4 en el peritoneo de esos ratones incrementó la artritis inducida por la transferencia de los autoanticuerpos. Nishio inyectó poli I:C y LPS en ratones por vía intraperitoneal varias veces y vio que la administración repetida del análogo sintético aceleró el desarrollo de pancreatitis e incrementó los niveles de IL-10 e IL-12. Los LB-1 peritoneales de ratones poseen el receptor pareado tipo inmunoglobulina de células B (RPI-B), que regula negativamente la señalización intracelular derivada del TLR9. Kubo encontró que sin RPI-B en los LB-1 murinos producían anticuerpos IgM naturales, incluyendo autoanticuerpos como el factor reumatoide estimulando con el oligodexonucleótido CpG-B in vitro e in vivo. Las CDs

plasmacitoides se activan más por complejos inmunes conformados por IgG unida al ADN, que por complejos inmunes constituidos por proteínas, haciéndolas producir citoquinas como el INF- $\alpha$  y quimioquinas. La activación por los complejos inmunes del suero de los pacientes con LES, y con otras enfermedades reumáticas se debió a la unión dual al RFc- $\gamma$ , y al TLR9. Barrat usó inhibidores de los TLR 9 y 7, que mermó la producción de INF- $\alpha$  por las CDs al ser estimuladas por complejos inmunes de pacientes con LES. Papadimitraki halló más LB y monocitos con el TLR9 en el LES activo que en la etapa inactiva, y observó que al aumentar los LB con el TLR9 había anticuerpos anti-dsADN.

#### **Ligandos endógenos de los TLR y procesos autoinmunes.**

Los autoantígenos pueden unirse a los TLR y producir patología. El ligando más analizado corresponde al del ARN, o sea los TLR7 y TLR8. El ARN simple rico en uridina es un ligando efectivo, y se determinó la relevancia del ARN y del ARNm como activador del TLR3, y de la proteína nuclear Sm unida al ARN u otras ribonucleoproteínas. Así, moléculas del ARN de tejido dañado o contenidas dentro de células endocitadas serían un ligando endógeno para los TLR que activaría la respuesta inmune. La limpieza de células apoptóticas por macrófagos es deficiente en el LES y las moléculas del ADN libres promoverían la formación de anticuerpos contra ellas, y sus complejos inmunes IgG/cromatina actuar como autoligandos activando los TLR. Barrat y Avalos, con complejos inmunes de LES, activaron los TLR7 y 9. En la búsqueda de ligandos endógenos para los TLR en la AR, se identificaron en la sinovial, proteínas como el fibrinógeno, las HSP y la fibronectina, que son ligandos del TLR4, a excepción del fibrinógeno y la HSP 60 que interaccionan con el TLR2. En el líquido sinovial de esos mismos individuos está el biglicano, un componente de la matriz extracelular, y fragmentos del ácido hialurónico todos con capacidad de interacción con los TLR 2 y 4.

#### **Mecanismos celulares que participan en el desarrollo y sostenimiento de la enfermedad autoinmune.**

Los TLRs participan en la activación o potenciación fisiopatológica de las enfermedades autoinmunes. Se propuso la pérdida de la tolerancia inmunológica por los LB. El LES se caracteriza por la presencia del ADN o ribonucleoproteínas que están siendo liberadas o expuestas al ambiente extracelular como resultado de la apoptosis. Así, los LB pueden reconocer estos autoantígenos al ser ligandos para los TLR y, luego, diferenciarse a células productoras de autoanticuerpos. Es posible que las CDs inicien la autoinmunidad por medio de la expresión de los TLR, que reconocen ácidos nucleicos o ligandos endógenos libres y, contribuir a la presentación antigénica de estas moléculas, activando posteriormente a LB y a LT. Las subpoblaciones de CDs producen citoquinas en respuesta a los TLR como IL-2 e INF- $\alpha$ , que influyen en la respuesta de LB. El INF- $\alpha$  interviene en la activación, diferenciación y supervivencia de los LB, LT y dendríticas; si se tiene en cuenta que en las enfermedades autoinmunes hay una regulación positiva de este INF y los genes inducibles por él, se puede tratar de un mecanismo importante en la potenciación del proceso patológico. Los LB autorreactivos se perpetuarían por la señalización mediada por el TLR y el RFc $\gamma$ , que reconoce y endocita a los complejos inmunes. Al internalizarlos a compartimentos endosomales, el ácido nucleico puede interaccionar según su afinidad con uno de los 4 TLR presentes, desencadenando vías de señalización intracelular que activarán al LB y lo harán proliferar. Este proceso puede acontecer en las CDs gracias a la expresión del RFc $\gamma$ II y de los TLR 7 y 9, induciendo una alta producción de INF- $\alpha$  y de citoquinas. Así, se encontró una alta expresión del TLR9 en los glomérulos de pacientes con nefritis lúpica.

Otra posibilidad para la potenciación de la autoinmunidad son los LT reguladores (LT-reg), cuyo papel es mantener la tolerancia y regular a las células autorreactivas en los tejidos periféricos. La activación de LT-reg por los TLR expresados en ellas puede aumentar o disminuir su actividad supresora influyendo en la autoinmunidad. (31,-32).

### **Respuesta inmune innata y DA.**

La DA es una patología inflamatoria de la piel caracterizada por anormalidades en la barrera cutánea y una respuesta inmune a antígenos ambientales del tipo Th2. La patogenia comienza por alteraciones en la función de la epidermis que interacciona directamente con el ambiente, y expresa receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) para la inducción de la respuesta inmune innata.

### **PRRs en los queratinocitos humanos.**

Estos forman una formidable barrera física en la epidermis, siendo el TLR2 inducido por patógenos (*Staphylococcus aureus* y *epidermidis* y *Malassezia furfur*) o por injurias al tejido cutáneo. Los pacientes son más susceptibles a las bacterias, hongos y virus que afectan a la piel con alteración de la inmunidad innata que aumenta el riesgo de infecciones bacterianas y virales. Se observan defectos en la expresión de los PRRs en pacientes con DA que comprometen la acción antimicrobiana. Kong comprobó un aumento de la presencia de *S. aureus* y de *S. epidermidis* en lesiones agudas de DA, lo que se normalizaba durante la remisión. Los queratinocitos producen un amplio rango de mediadores. En la fase aguda de la DA se desarrolla un perfil inmune Th2, inducido por sus citoquinas derivadas de los queratinocitos como la linfoproteína del estroma tímico (TSLP), las IL 25 e IL 33. La TSLP actúa como un activador de CD11+ CDs y su capacidad para producir LTCD4-Th2 de memoria, y sus citoquinas. La TSLP aumenta su expresión tanto en lesiones crónicas como agudas y no se detecta en la piel sin lesiones. Son importantes en la DA, la TSLP, los patógenos, los alérgenos e injurias que alteran la barrera cutánea modificando la función de los PRRs.

### **Nuevos mecanismos de la inmunidad innata en la patogenia de las DA y DAC.**

El TLR2 es importante en la respuesta Th1 en la sensibilización cutánea, expresándose en los LT, LB, mastocitos, eosinófilos, macrófagos, CDs, queratinocitos, células epiteliales, fibroblastos, y miocitos. El TLR2 se activa y aumenta su expresión por la acción de los LPS, la IL-1, el TNF $\alpha$  y el INF $\gamma$ , que lleva a la respuesta Th1. Los ratones carentes del TLR2 tienen una respuesta Th1 deficiente. En alergias, el efecto del TLR2 se discute. Algunos sugieren que inhibe la respuesta, y así tenemos que agonistas de TLR2 reducen la inflamación de las vías aéreas, la hiperreactividad bronquial y los niveles séricos de IgE específica después del reto antigénico. La piel de pacientes con DA está colonizada por *S. aureus*, fuente de ligandos para el TLR2, y también posee ligandos endógenos derivados del eosinófilo. Monocitos y queratinocitos de la DA tienen una anormal inmunidad innata debido a la función alterada del TLR2. Las lesiones agudas de DA poseen la expresión local de un perfil de citoquinas Th2 y las lesiones crónicas a una mezcla de citoquinas Th1 y Th2. Las alteraciones de los queratinocitos y el engrosamiento epidérmico en la DA se debe a las citoquinas Th1. El TLR2 y la respuesta al INF $\gamma$  promueven el engrosamiento epidérmico en ratones con DA producida por sensibilización epicutánea con ovoalbúmina (OVA), así como en un modelo experimental de dermatitis alérgica por contacto (DAC) producida por sensibilización con el hapteno oxazolone (OX). Así, se demuestra que el TLR2 es importante para la respuesta Th1 a sensibilización epicutánea con antígenos proteicos y a la sensibilización por contacto con haptenos. El rascado y la injuria cutánea que alteran la



capa córnea promueven la expresión del TLR2 mediante la estimulación del NF- $\kappa$ B. En ratones que son deficientes en TLR2 y que presentan baja respuesta Th1 y, disminución de INF- $\gamma$  no se produce el engrosamiento epidérmico, pero tienen una respuesta Th2 normal con expresión local de IL-4. El TLR2 es también fundamental en la respuesta Th1 en la DAC, mientras los ratones deficientes en TLR2 no produjeron IgG2a, pero sí IgG1 cuando fueron sensibilizados por contacto con haptenos. El INF- $\gamma$  conduce a una respuesta con IgG2a y la IL-4 a una respuesta con IgG1. Las CDs esplénicas de los ratones deficientes en el TLR2 fueron incapaces de producir células Th1 a partir de LTCD4+ en presencia de OVA, en cambio, la respuesta Th2 se mantuvo intacta. El INF- $\gamma$  de las lesiones crónicas de DA juega un papel en la apoptosis de queratinocitos y en perpetuar la inflamación de la piel. El impedir la unión del TLR2 y su ligando disminuiría la respuesta Th1 a antígenos percutáneos, tanto en la DA como en la DAC, así como, inhibir el engrosamiento epidérmico.

### **Bibliografía.**

- 1.-Haoli Jin : Toll-like receptor 2 is important for the Th1 response to cutaneous sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 2009; 123 (4): 875-882.
- 2.-López J. : Viral and bacterial patterns induce TLR-mediated sustained inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells . *Int J. Cardiol*, DOI:10.1016/j.ijcard. 2010; 12.089
- 3.- Hamann L.: A frequent Toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronaryrestenosis. *Journal of Molecular Medicine*. 2005; 83: 478-485.
- 4.-Martínez- Córdova, Zuzet; Calzadilla-Lugo, Flora; Artiles-Valor, Adriana. : Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores de peaje (Toll-R) en la enfermedad y en el trasplante. *Bioquímica*, 2009 ; 34, (2), abril-junio, 83-94.
- 5.-Xiaoping Yang. E. : Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009; 53 : 6,-9.
- 6.- Rolf Spirig, Janice Tsui, Sidney Shaw.: The emerging role of TLR and innate immunity in cardiovascular disease. *Cardiology Research and Practice*, 2009; 2 : 12-15.
- 7.- Bustamante J.: Toll-like receptors 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis. *Rev Esp Cardio*, 2011; 64 (11): 1056-1059.
- 8.- Brons C.A. : A rare polymorphism in the gene for Toll-like receptor 2 is associated with systemic sclerosis phenotype and increases the production of inflammatory mediators. *Arthritis & Rheumatism.*, 2012; 64, (1) : 264-271.
- 9.- Roitt I.,Delves P.J. : *Inmunología. Fundamentos*. Ed. Méd. Panamericana. Buenos Aires. 2003.
- 10.-Park H.J., : Association of toll-like receptor 2 polymorphisms with National Institute of Health Stroke Scale scores of ischemic stroke patients. *J. Mol Neurosci.*, 2012; 46 (3) :536-40
- 11.-Hsin kuo, Takeshi Yoshida, Anna De Benedetto, Lisa A Beck: The Cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol.*, 2013; 131(2): 266,-78
- 12.-Abbas A K. : *Inmunología celular y molecular*. Madrid. Edit. McGraw-Hill Interamericana, 2002: 3,-17.
- 13.- Medzhitov R.: A human homologue of the Drosophila Toll protein signal activation of

- adaptive immunity. Nature, 1997; 388: 323-324.
- 14.- Akira S.: Toll-like receptor signaling. J Biol Chem, 2003; 278: 38105-38108.
  - 15.- Lemaitre B.: The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 1996; 86: 973-983.
  - 16.- Rock F L.: A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95: 588-593.
  - 17.- Albiger B.: Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. J Int Med, 2007; 261: 511-528.
  - 18.- Takeda K.: Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, 2003; 21: 335-376.
  - 19.- Trinchieri G.: Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. Nat Rev Immunol, 2007; 7: 179-190.
  - 20.- Matsumoto M. : Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J Immunol, 2003; 171: 3154-3162.
  - 21.- Shimazu R. : MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med, 1999; 189: 1777-1782.
  - 22.- Hawn T R. : A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellid signaling and is associated with susceptibility to legionnaires´disease. J Exp Med, 2003; 198: 2487-2489.
  - 23.-Heil F. : The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR, 8 and 9 subfamily. Eur J Immunol, 2003; 33: 2987-2997.
  - 24.- Hacker H.: CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. EMBO J., 1998; 75 : 6230-6240.
  - 25.- Zhang D.: A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science, 2004; 303: 1522-1526.
  - 26.- Brogdem K A. : Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacterias. Nature, 2005; 3: 238-250.
  - 27.- Villarruel R. : Péptidos Naturales Antimicrobianos : escudo esencial de la respuesta inmune. Inv Salud, 2004; 3: 170-179.
  - 28.- Chalifoor A.: Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. Blood, 2004; 104: 1778-1783.
  - 29.- Liu A Y.: Human -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, and the state of differentiation. J Invest Dermatol, 2002; 118: 275-281.
  - 30.- O´Neil D. Expression and regulation of the human -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. J. Immunol, 1999; 163: 6718-6724.
  - 31.- Selleri S. : Toll-like receptor agonist regulate B-defensin 2 release in hair follicle. Br J Dermatol, 2007; 156: 1172-1177.
  - 32.-Faure E.,Thomas L., Xu M, Medvedev A, Equils O, Arditi.M. : Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. J. Immunol, 2001 ; 166: 2018-2024.

+++++\*\*\*\*\*+++++

## RECEPTORES DE LA INMUNIDAD CONNATURAL

Angel Alonso, Santiago R. Rodríguez.

Nosotros estamos expuestos a los microorganismos del ambiente. Su invasión es contenida por el Sistema Inmune con sus mecanismos connatural (**RIC**) y adquirido (**RIA**).

La **RIC** es la primera línea de defensa y de acción inmediata, con sus barreras físicas (epitelios), las células asesinas naturales (NKC), las células dendríticas (CD), los macrófagos (MØ), los leucocitos polimorfonucleares (PMN), y los receptores de las NK, los de unión a manosa y los TLR. Hay componentes solubles, como los péptidos antimicrobianos naturales (PAN), el sistema del complemento (SC), y citoquinas como el FNT- $\alpha$ , la IL-1, la IL-12 y la IL-18. Los componentes de la **RIC** son indispensables para la inducción e inmunoregulación de la **RIA**. Esta se desarrolla si los patógenos no son eliminados por la **RIC**, y posee características como: alta especificidad, memoria inmunológica para responder a las reexposiciones, y la respuesta inflamatoria para destruir al patógeno junto con las CD, LB y/o LT.

La **RIC** y **RIA** bien conectadas erradicarán al patógeno dando inmunidad al hospedero. Fallas en la discriminación de lo propio y lo no propio, en ambas respuestas, favorecen la proliferación de patógenos, el desarrollo y mantenimiento de las enfermedades autoinmunes y las alergias. En este contexto, los microbios son reconocidos por la **RIC**, el SC, los receptores de las NK y los TLR.<sup>(12-13-14-15)</sup> La inflamación incluye a la IL-1, cuyo miembro más conspicuo es la IL-1 $\beta$ , que requiere la proteólisis por complejos multiproteicos citoplasmáticos o inflamomas. Son parte de la **RIC**, y promueven el desarrollo de la **RIA**. El reconocimiento de los patógenos se realiza por receptores con afinidad para lípidos, carbohidratos, péptidos y ácidos nucleicos de los microorganismos llamados **patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP)**, que son invariables y frecuentes. Hay receptores especializados para el reconocimiento de **PAMPs** asociados a patógenos (**PRR**), que se encuentran en cada célula, y con igual función.

Un solo receptor genera una respuesta por su interacción con varios ligandos que son estructuralmente distintos. La especificidad de los **PRR** es tan fina que 2 **PRR** distintos distinguen porciones de una molécula y no entrecruzan sus respuestas. Una vez activados, los **PRR** envían señales intracelulares para la síntesis de mediadores. Las 2 familias de **PRR** más estudiadas son los **TLR** (Toll like receptors) y los **NLR** (NOD like receptors); pero hay otros **PRR** como las helicasas tipo RIG, lectinas tipo C, receptores purinérgicos y scavenger. Los **PRR** se ubican en las membranas plasmática o endosomal, y en el citosol o solubles (como PGR -peptidoglycan recognition proteins-, colectinas, MBL -mannan-binding lectin-, y pentraxinas). Los **PRR** mejor caracterizados son los **TLR**, que son 15 en humanos (**TLR-1** a **TLR-15**), 10 bien caracterizados, cuyos ligandos se conocen, mientras que los restantes 5 no se conocen bien. Los receptores de tipo lectina **C** (CLR) detectan carbohidratos de bacterias, virus y hongos, y son la dectina-1 y dectina-2, o **CLEC7A** (C-type lectin domain family member A) y **CLECF4N** (C-type lectin domain family member N), la **DEC-205** (dendritic and epithelial cells, 205 kDa), el **MR** (receptor de manosa) y el **Mincle**. Los citosólicos tipo ANA helicasa (**RLR**) incluye a **RIG-I** (retinoic acid-induced gene I) y a **MDA-5** (Melanoma differentiation-associated gene-5). Los tipo **NOD (NLR)**, detectan componentes microbianos y endógenos liberados por alteraciones celulares o **DAMP**

(damage/ danger associated molecular patterns), e incluyen los **NOD1** y **NOD2** (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein), los **NLRP** (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein) y los **NLRC** (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing protein). Otros reconocen ácidos nucleicos en el citoplasma, que son **IFI16** (INF- $\gamma$ -inducible protein Ifi16) y **AIM-2** (absent in melanoma-2), que son la familia **ARL** (**AIM2**-like receptors). Existen además otros no clasificados, como **TREM** (triggering receptor expressed on myeloid cells) y **DAI** (DNA-dependent activator of INF-regulatory factors, o **DLM-1/ZBP1**). (16-17-18-19-20).

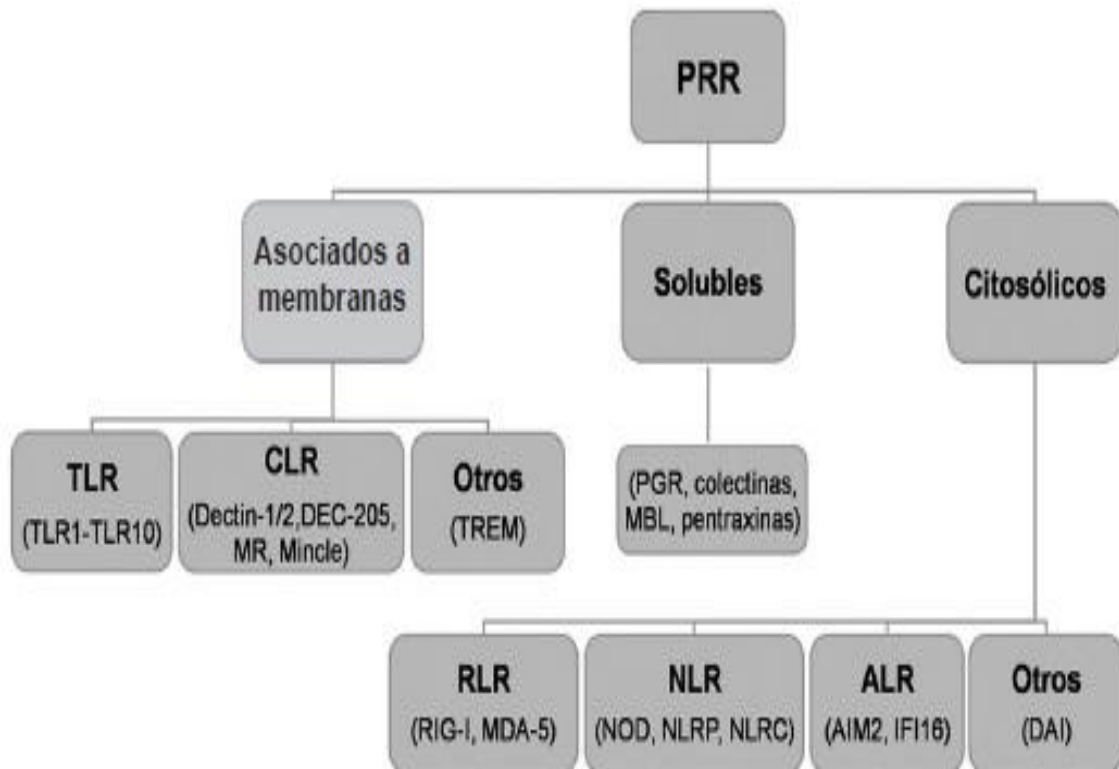


Figura 1. Principales familias de receptores de reconocimiento de patrones (ver texto)

### Receptores del tipo Toll (TLRs).

Son transmembrana del tipo 1 con homología con la proteína **Toll** de la *Drosophila melanogaster* y el receptor de la IL-1 (IL-1R). Esta similitud se da en el dominio intracelular de la proteína **Toll**, y con los dominios intracelulares del IL-1R de los mamíferos. Los **TLRs** se expresan en las CD, los MØ, los PMN, los LB y LT, las células endoteliales y las epiteliales. Homólogos humanos de la proteína **Toll** inducen la activación del NF- $\kappa$ B, revelando que los **TLRs** y el IL-1R activan igual vía de transducción de señales. Los **TLRs** juegan un gran papel en el sistema inmune de los mamíferos y en las enfermedades infecciosas. Reaccionan con antígenos del ambiente e incluso propios, y contribuyen a las enfermedades alérgicas y autoinmunes. Los **TLRs** son receptores de "vigilancia", ya que "vigilan" los tejidos para evitar las enfermedades.

### Estructura.

La secuencia de **Toll**, (año 1982), posee una estructura tripartita: una región N-terminal

extracelular con series en tándem de un motivo rico en leucina (**LRR**); una hélice monocatenaria transmembrana, y un dominio C-terminal citosólico emparentado con el dominio C-terminal del IL-1R. Tal dominio endocelular - región homóloga del **TLR** y del IL-1R o **TIR** - está involucrado en los insectos y en la respuesta inicial de los inmunocitos humanos. El grupo de Hoffmann, en Estrasburgo, (1995) descubrió que **Toll**, y otros miembros del grupo estaban involucrados no sólo en la morfogénesis sino en la **RIC** a los patógenos, en la mosca. Así, se identificaron, en los vertebrados, 12 homólogos a **Toll**. El dominio extracelular de los **TLR** es de 20 copias en tándem del motivo **LRR**, que tiene una estructura en herradura para el reconocimiento del ligando. A pesar de la conservación entre los **LRR**, diferentes **TLR** reconocen ligandos sin relación estructural alguna. La localización subcelular de los **TLR** se correlaciona con el patrón molecular de sus ligandos. Así, **TLR1**, **TLR2** y **TLR4**, de la membrana reconocen productos bacterianos que, actúan sobre ella, y los **TLR3**, **TLR7** y **TLR9**, reconocen estructuras mono y bicatenarias, de ARN o de ADN, y se expresan en el sistema reticuloendoplásmico, y son reclutados por los endosomas/lisosomas tras su activación. (21-22-23-24-25-26-27-28-29-30).

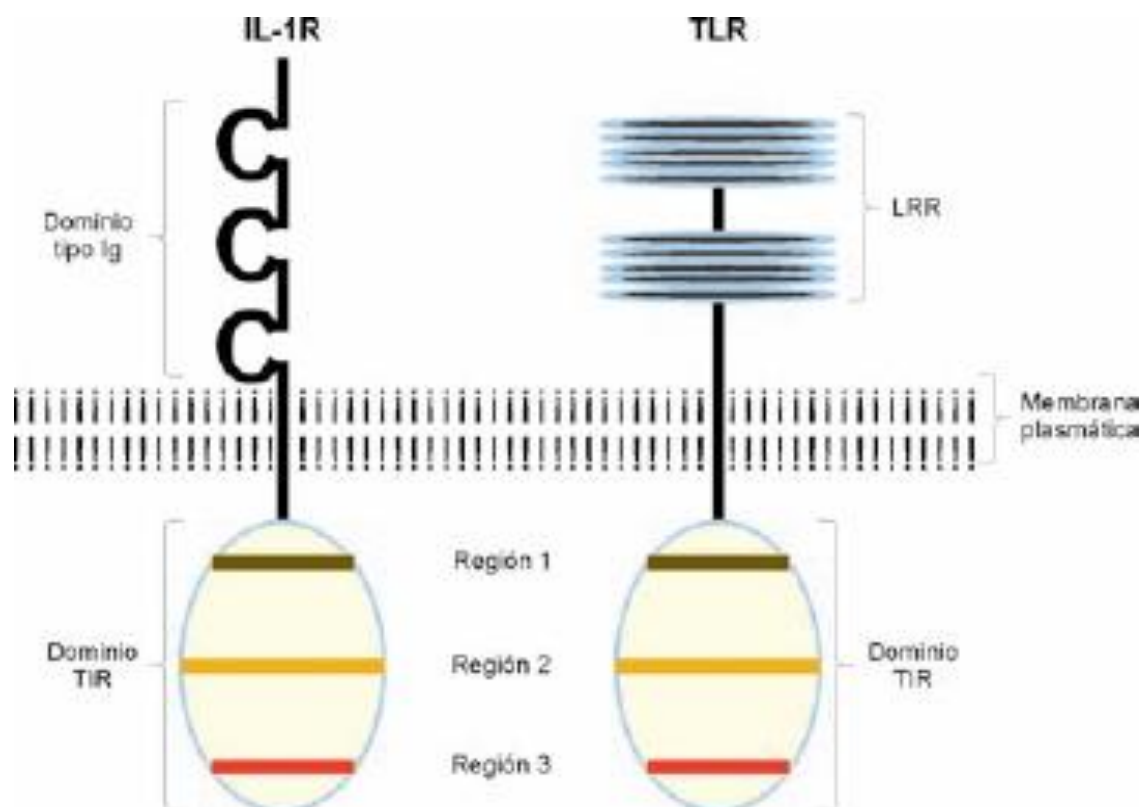


Fig. 2: Los receptores tipo Toll (TLR) y los de IL-1R comparten un dominio citoplasmático muy conservado: dominio Toll / IL-1R (TIR). El dominio TIR posee 3 regiones (1, 2, 3) con

iguales dominios C-terminales, y regiones extracelulares diferentes. IL-1R tiene 3 dominios de Ig y TIR tándems de regiones ricas en leucina (LRR).

### **Cascada de Señalización.**

La transducción de señales es desde fuera de la célula a su interior. Es simple, como las moléculas del receptor de la acetilcolina, que son canales, que permiten que el movimiento de iones pase al interior de la célula. Esto cambia su potencial eléctrico que propaga la señal. Una transducción más compleja involucra el acoplamiento del ligando a su receptor y eventos intracelulares, con fosforilaciones por tirosina-quinasas y/o quinazas de serina/treonina. El resultado es una alteración de los genes que se expresan. La activación del **TLR** se produce por la unión con el ligando afín, y por 2 vías de señalización. Una conduce a la activación del **NF-κB** y las **MAPKs** (quinazas activadas por mitógenos) **p38** y **JNK** (c-Jun quinasa), y la otra se activa por **TLR3** y **TLR4**, y conduce a la activación del **NF-κB** y del **IRF3** (interferón factor regulador-3). Ello involucra a los genes antivirales como del **INF-β**. Así, los **TLR** adaptan la **RIC** a patógenos que reconocen ácidos nucleicos desde los endosomas, o lípidos y proteínas desde la membrana celular, donde están **TLR1**, **TLR2**, **TLR4**, **TLR5**, **TLR6** y **TLR10**; recientemente se agregaron **TLR11**, **TLR12** y **TLR13**. Los **TLR** endosomales incluyen **TLR3**, **TLR7**, **TLR8** y **TLR9**, y reconocen al ARN y al ADN.<sup>(31-32-33)</sup>

Tras acoplar al ligando, **TLR / IL-1R**, un dominio de homología, dimerizan, hacen un cambio conformacional e inician las señales nucleares. El alistamiento de las moléculas «adaptadoras» es secuencial y ordenado. Eligiendo el **TLR4** como referencia, tras acoplar al LPS, el **TLR** elige entre 2 opciones: vías de señales dependiente o independiente del **MyD88** (proteína 88 de diferenciación mielóide primaria). El interruptor **TIRAP / Mal** pone en marcha la primera; el interruptor **TRAM**, la independiente. La primera es una vía rápida y la segunda es lenta.<sup>(34-35-36-37-38)</sup>

### **Vía MyD88 dependiente.**

Esta proteína se une a los **TLRs** por los dominios **TIR** de ambas moléculas, que permite que **MyD88** se una a la **IRAK-4** (quinasa 4 asociada al IL-1R) a través del dominio intermedio (DI), y a **IRAK-1** mediante su dominio de muerte (DD); la proximidad entre ambas quinazas provoca que **IRAK-4** fosforile a **IRAK-1**, y éste, fosforilado se una a **TRAF-6** (factor asociado al receptor del FNT), ambos se disocian del receptor e interactúan con **TAK1** (quinasa activada del TGF-β), y **TAB1** y **2** (proteínas de unión a **TAK1**). Con este complejo hay 2 vías independientes de señalización: una que activa a las MAP quinazas y otra que activa al **NF-κB**. En la primera ruta, la activación de **TAK1** fosforila a las **MAPK** quinazas (**ERK**, **JNK** y **p38**) promoviendo la translocación nuclear del factor **AP1**; en la segunda vía, **TAK1** fosforila a las quinazas del (**IKK**), que a su vez lo fosforilan, marcándolo para su ubiquitinación y destrucción en el proteasoma. El **NF-κB** (p50, p65) se transloca al núcleo, y allí, el factor transcripcional se une a los promotores de sus genes blanco.<sup>(39-40-41-42-43-44)</sup>

### **Vía MyD88 independiente.**

Sólo la emplean **TLR3** y **TLR4**; ambos señalizan por la proteína **TRIF** (adaptador que contiene el **TIR** e induce **INF-β**), y sólo **TLR4** ocupa a la proteína **TRAM** (molécula adaptadora de **TRIF**). La señalización de esta vía posee estasecuencia: la proteína **TRIF** recluta al complejo **TRAF6-TAK1-TAB2** que activa a las **IKK's** y liberan al **NF-κB**. Por otra vía, **TRIF** interactúa con el dímero **TBK1/IKK** translocando al **IRF-3** y provocando la síntesis del **INF-β**.<sup>(45-46-47-48)</sup>

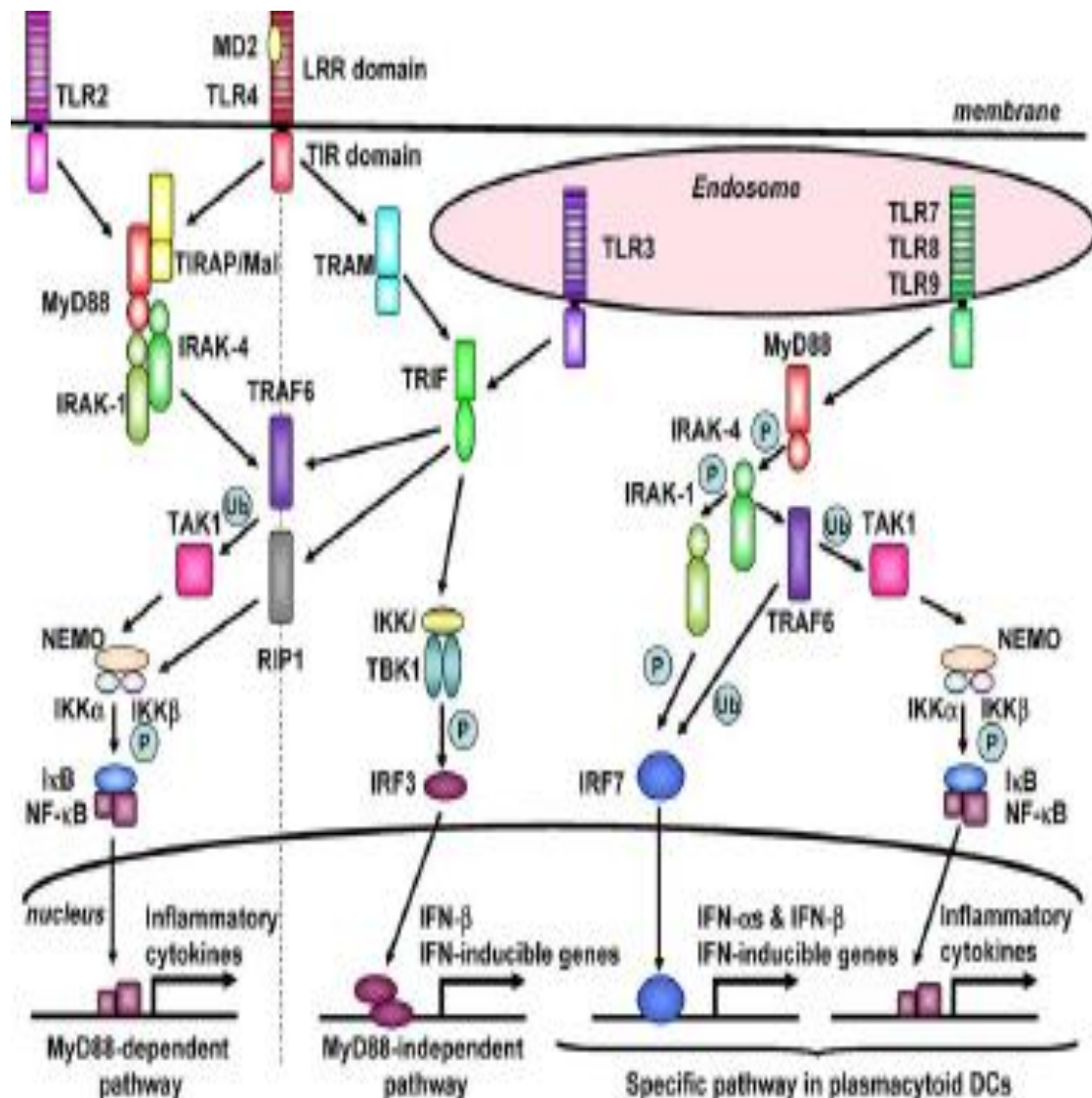


Fig. 3: Vías de señalización de los TLRs con las 2 rutas dependiente e independiente de MyD88.

Al no identificar un receptor del LPS impidió comprender como las bacterias Gram-negativas iniciaban la inflamación. El organismo infectado usaría una proteína libre, circulante, o proteína acopladora del LPS (**LBP**) y del receptor opsónico **CD14**. La **LBP** compete con lipoproteínas por el LPS, pues éste ligado a aquellas forma micelas inertes que no liberan citoquinas. La forma estable del **CD14**, en la membrana (**mCD14**), se ancla a la misma por el glicosilfosfatidilinositol. En la circulación, está libre, como CD soluble (**sCD14**). Las células que son **CD14** negativas, como las CD, fibroblastos, musculares lisas o del endotelio vascular, responden al complejo [**LBP-LPSsCD14**]. El sCD14 del suero de individuos sanos, se incrementa en los procesos inflamatorios. Ni sCD14 ni mCD14 tienen un endodominio intracitoplasmático, pero un eslabón conecta [**LBP-LPS-CD14**] con el interior celular. Los **TLRs** reconocen a los **PAMPs**, pero para que se produzca activación se requiere el correceptor **MD-2**. Así, se completa el complejo inicial: [**(LBP)-LPS-(CD14)**][**TLR-**



MD-2]. La misión de **LBP** es llevar, con **sCD14** o sin él, al LPS hasta el complejo receptor, y la de **CD14** es presentar el LPS a **TLR**. Del **TRAF6**, activado, se libera del complejo I; luego, acopla 2 ubiquitininas **UEV** y **UBC** y se une a 3 componentes: una quinasa **MAP-KKK-TAK1**, y 2 proteínas adaptadoras, **TAB1** y **TAB2** que acompañan a la quinasa. La ubiquitinación del **TRAF6** permite activar **TAK1** en el complejoII: [**TRAF6-UEV1A-UBC13-TAK1-TAB1-TAB2**]. **TAK1** completa la señalización. **TAK1** tiene 2 opciones: actuar sobre el complejo **IKK**, o elegir la vía **JNK/ p38**. La primera activa al **NF-κB**, la segunda con la **AP-1** a 2 factores nucleares (**IKK-1** e **IKK2**) y una subunidad reguladora **IKKγ**(o **NEMO**). Tras la activación por estas señales, **IKK** fosforilalos **IκBs**, lo que conduce a su poliubiquitinación y degradación proteasómica. La eliminación de los inhibidores deja libre al **NF-κB**. Hay otra vía de activación del **NF-κB**, en la que **NIK** activa a **IKK-α**, que convierte a un inactivo **NF-κB** (p100), en la forma activa p52. También, **TAK1** puede elegir la vía **MAPK JUN** y **p38** con el resultado indicado. La elección del interruptor **TRAM** por el **TIR** activado, moviliza la vía independiente de **MyD88**.<sup>(49-50-51-52-53-54-55).</sup>

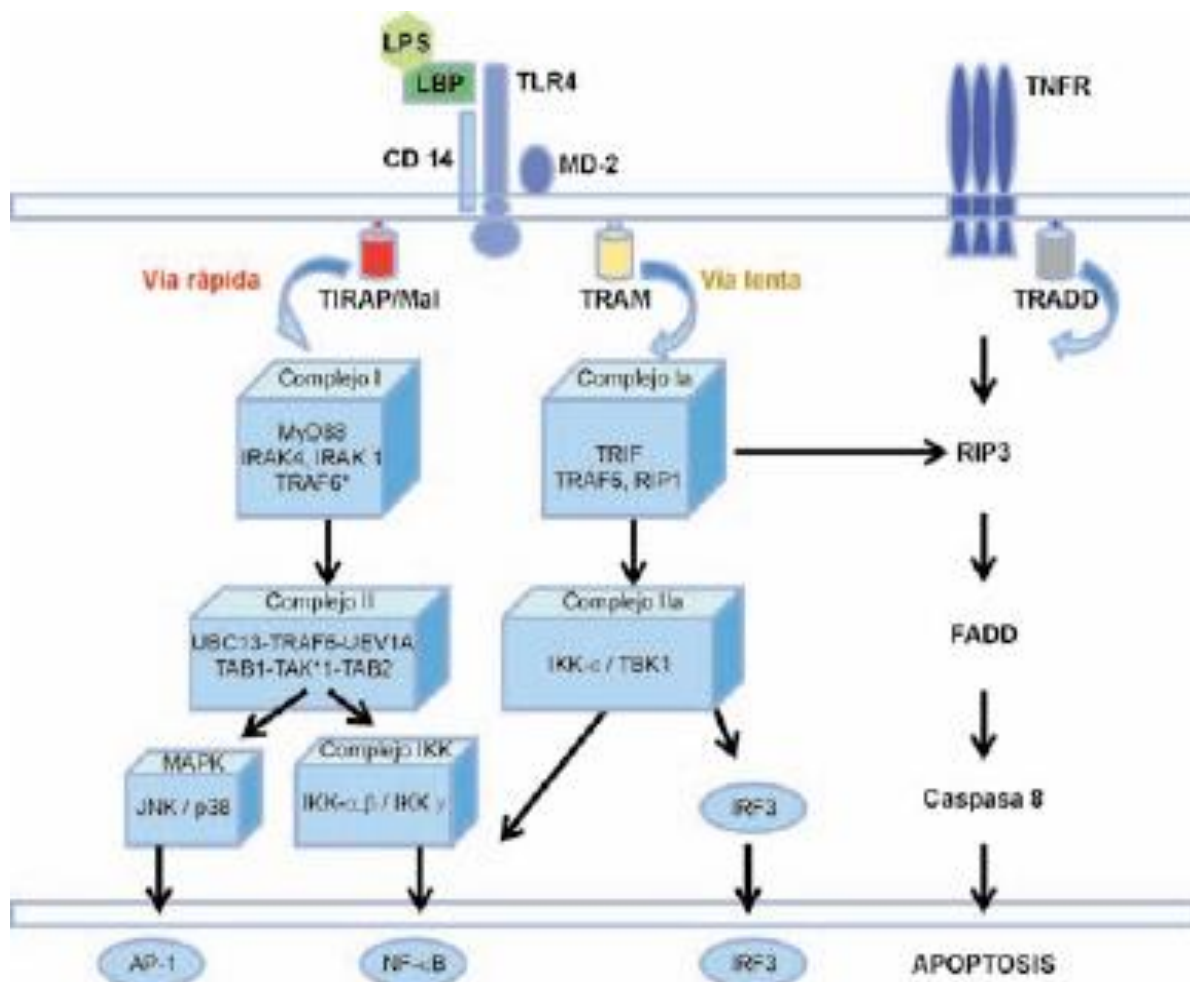


Fig. 4. En la vía TLR4, luego del estímulo recibido la señal elegirá entre la vía Mal / MyD88 y la vía TRAM / TRIF. La vía rápida origina complejos moleculares que activan a los **NFκB** y **AP-1**. La señal de **TRAM / TRIF** o lenta favorece la apoptosis por **RIP1/ RIP3** (adaptadores en la vía de señales del FNT.)

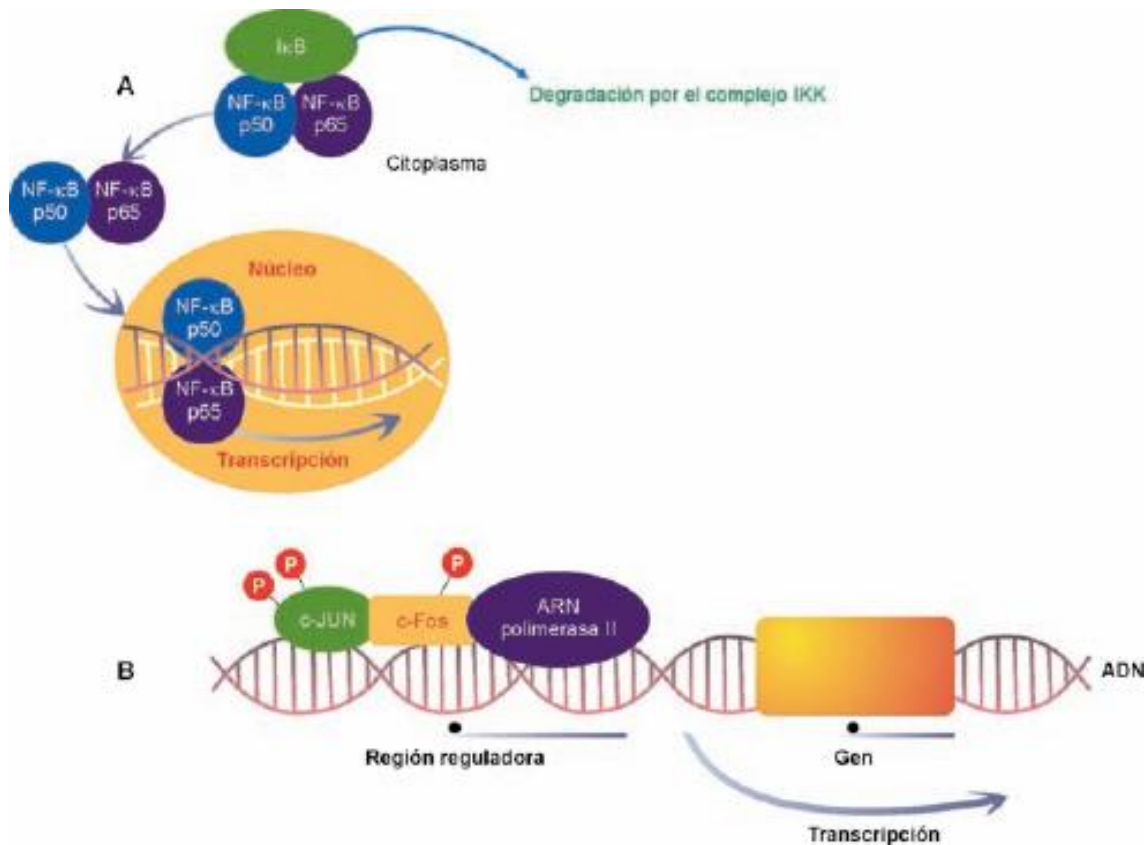


Fig. 5. Los factores de transcripción están compuestos por 2 regiones: un dominio de acoplamiento al ADN y un dominio activador. El primero, son aminoácidos que reconocen secuencias de bases en el ADN, cercanas al inicio de la transcripción. Se clasifican por la estructura del acoplamiento al ADN en: dedos de zinc, hélice-vuelta-hélice, cremallera de leucina, hélice-asa-hélice y grupos de alta movilidad. Los activadores interactúan con la ARN polimerasa, y con proteínas que afectan la eficiencia. Son activados o inhibidos por estímulos fisiológicos, patológicos o farmacológicos. El Rel/NF- $\kappa$ B y la AP-1 están involucrados en la inflamación. (A). Los Rel/NF- $\kappa$ B acogen homo- y heterodímeros porque el dominio de dimerización y acoplamiento al ADN está muy conservado. La familia incluye a los complejos heterodimérico p50/p65 y homodimérico p50/p50. En las células, NF- $\kappa$ B está inactivo en el citoplasma acoplado a la proteína I $\kappa$ B, que enmascara el acoplamiento del NF- $\kappa$ B por un enlace de no-covalente. Moléculas endógenas y exógenas disocian al complejo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B. La fosforilación de I $\kappa$ B se marca con ubiquitina, y el reconocimiento por el proteosoma que degrada I $\kappa$ B fosforilado. NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo, se une al ADN específico y transcribe los genes involucrados en la respuesta mediada por NF- $\kappa$ B, como el pro-FNT- $\alpha$ , moléculas de adhesión, COX2 o iNOS. (B). La proteína activante-1 (AP-1) son homo- y heterodímeros de proteínas tipo cremallera de leucina. Incluye a: Jun (c-Jun, v-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, v-Fos, FosB, Fra1, Fra2), Fos (c-Fos, v-Fos, FosB, Fra1, Fra2) y factores de transcripción relacionados (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF).

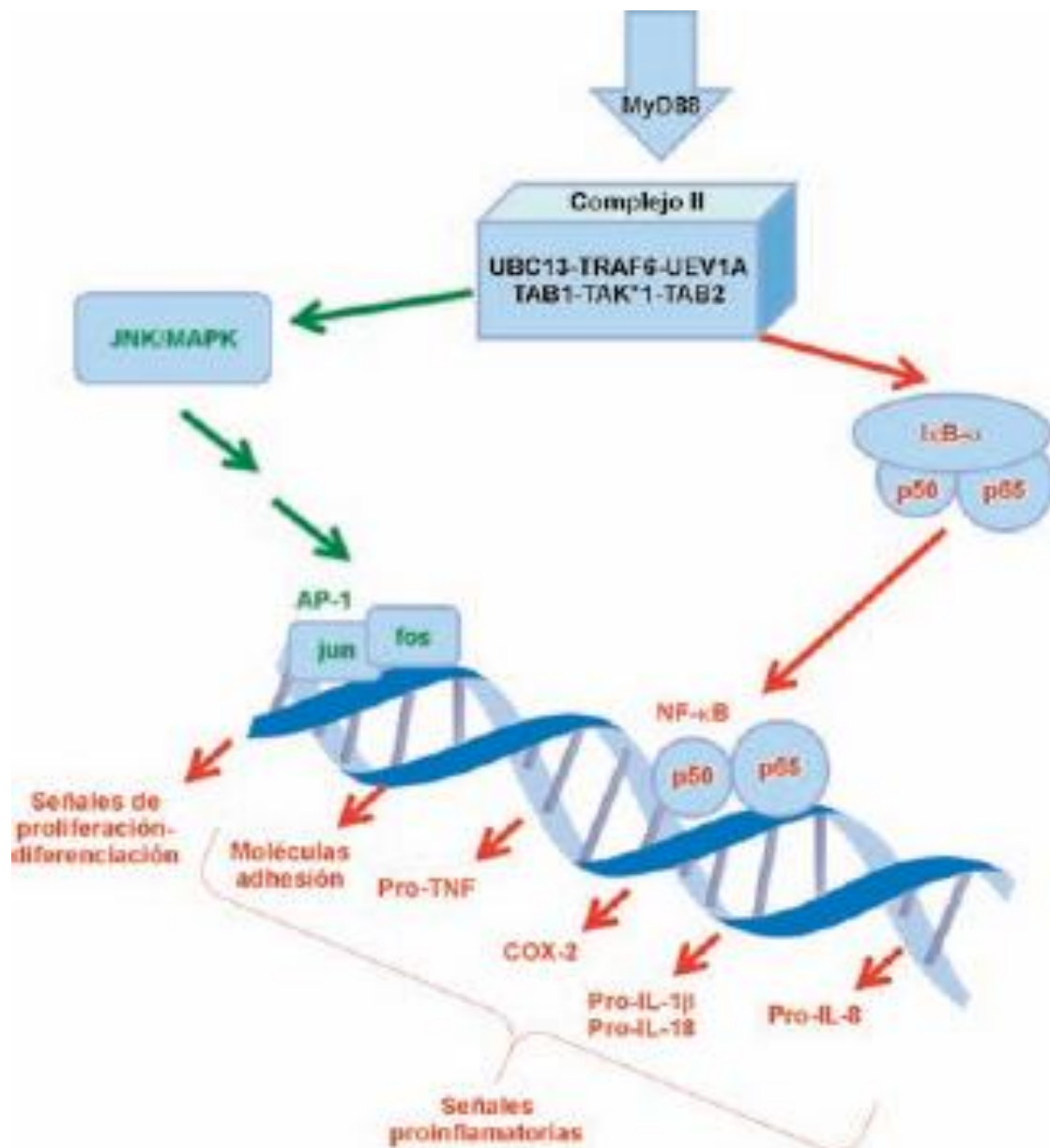


Fig. 6. Estimulación de los TLR. Los factores NF-κB y AP-1 inducen la expresión de genes (pro-IL-1, 8 y 18, pro-FNT, moléculas de adhesión, COX2, iNOS).

### Ligandos.

Los **TLRs** se dividen en 2 categorías: a) los que se localizan en la membrana celular y b) los que se encuentran en los endosomas. El reciente **TLR-15**, se asocia con el reconocimiento de *Salmonella* sp. Los genes TLR que los codifican se localizan en los cromosomas 4p14 (TLR1), 4q32 (TLR2), 4q35 (TLR3), 9q32-33 (TLR4), 1q33.3 (TLR5), 4p16.1 (TLR 6), Xp22.3 (TLR7), y 3p21.3 (TLR9).

**TLR1:** reconoce los lipopéptidos de la *Borrelia burgdorferi* y, con el TLR4 inhibe su señalización en células endoteliales; además tiene interacción con otros TLRs, como el TLR2 y formando heterodímeros con el TLR6.

**TLR 2:** reconoce componentes de Gram+, lipoproteínas y lipo-péptidos de bacterias, GPI del *Trypanosoma cruzi*, componentes de la pared de las levaduras, el lipoarabinomano del *Mycobacterium tuberculosis* y al lipopéptido-2 del *Mycoplasma* (MALP-2). Su activación

es similar a los del TLR-4 e IL-1, con la acción de MyD88, IRAK y NF- $\kappa$ B. Forma heterodímeros con TLR1 y TLR6.

**TLR 3:** reconoce al ARN de doble cadena. No usa la adaptadora MyD88. No posee prolina que es abundante en otros TLR. Está en los endosomas de las CD maduras. Durante la replicación viral, se produce ARN de doble cadena, induce a los INF  $\alpha/\beta$ , y activa a las CD.

**TLR 4:** fue el primero en describirse, y es esencial en detectar al LPS con los LBP, CD14 y MD2. Reconoce al Taxol, un diterpeno de la corteza de *Taxus brevifolia*, y a ligandos endógenos, como las proteínas del estrés térmico (HSP60 y HSP70), el dominio A de la fibronectina, los oligosacáridos del ácido hialurónico, el heparan sulfato y el fibrinógeno. Sólo estas moléculas activan a los M $\phi$  y a las CD para secretar IL-12. Es una alarma endógena para la reacción del tipo Th1.

**TLR 5:** reconoce a la flagelina y está en la parte basolateral de las células epiteliales del intestino, aunque se producen citoquinas en las células epiteliales del pulmón por la flagelina. Activa la expresión de moléculas co-estimuladoras y la presentación antigénica. Se une directamente al producto que detecta.

**TLR7 y 8:** reconocen ARN de cadena simple (ssRNA). **TLR7** detecta a la imidazoquinolina. El **TLR7** murino reconoce a la loxorribina, que tiene actividades antivirales y anti-tumorales, y al brotidirine, que activan al SIS al ser aplicados sobre la piel, en virosis y carcinomas. Las CD que poseen **TLR 7** y **9** al ser estimuladas producen INF- $\alpha$ . Al igual que **TLR3**, **TLR7** y **8** se expresan en los endosomas. **TLR 9:** detecta ADN con dinucleótidos no metilados CpG, e induce IL-12 y FNT- $\alpha$ , polarizando la respuesta a Th1. La unión se hace en el endosoma. En los ratones, reconoce al citomegalovirus (CMVM) en las CD dependientes del **TLR9**. A los queratinocitos, el **TLR 9** los estimula frente a los ADN de los patógenos. **TLR 11:** en ratones, se expresa en las células epiteliales urinarias y regula la resistencia a las bacterias uropatógenas; su ligando no se conoce.<sup>(56-57-58-59-60).</sup>

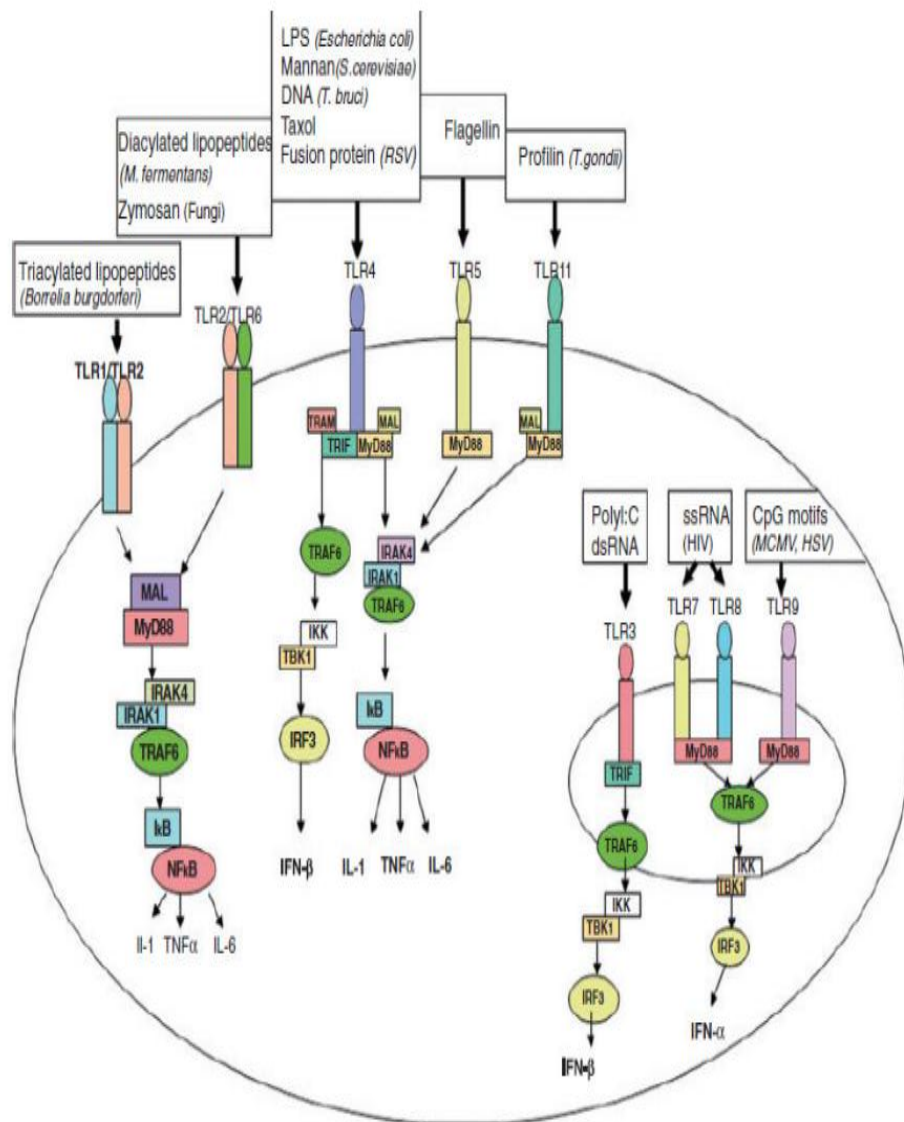


Fig 7: TLR's y diferentes ligandos para sus respuestas proinflamatorias y antivirales que proteínas adaptadoras para dar inicio a los factores de transcripción.

Tabla I. Receptores de la RIC localizados en las membranas y sus ligandos.

Receptor	Ligando	Localización subcelular	Patógenos reconocidos
<i>Receptores tipo Toll</i>			
TLR1	Lipoproteínas triaciladas	Membrana plasmática	<i>A. fumigatus</i>
TLR2	Ácido lipoteicoico, zimosán glicolípidos, glicoinositol-fosfolípidos y glicoproteínas	Membrana plasmática	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>K. pneumoniae</i>
TLR3	RNA de doble cadena, poli I:C	Endosomal	Virus de influenza Virus sincicial respiratorio
TLR4	LPS y lipoproteínas	Membrana plasmática	<i>P. aeruginosa</i>
TLR5	Flagelina	Membrana plasmática	<i>L. pneumophila</i>
TLR6	Lipopéptidos diacilados	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i>
TLR7	RNA de cadena sencilla, compuestos aromáticos sintéticos	Endosomal	Rinovirus
TLR8	RNA de cadena sencilla, imidazol	Endosomal	Virus de influenza Virus sincicial respiratorio
TLR9	DNA de doble cadena no metilado	Membrana plasmática y endosomal	<i>M. tuberculosis</i>
TLR10	Desconocido, sólo en células humanas	Membrana plasmática	
TLR11	Profilina	Membrana plasmática	
TLR12 y TLR13	Desconocido, sólo en células murinas	Desconocida	
<i>Receptores lectina tipo C</i>			
MR	Manosa, fucosa, N -acetil -glucosamina	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i>
DC SIGN	Glicoproteínas, ManLAM	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i>
Dectin -1	Beta-glucanos, zimosán	Membrana plasmática	<i>M. tuberculosis</i> <i>A. fumigatus</i> <i>P. jiroveci</i>
<i>Receptores scavenger</i>			
MARCO	Lípidos oxidados, ozono	Membrana plasmática	
SRA	Lípidos oxidados, LTA, epóxidos	Membrana plasmática	

TLR: Receptores tipo Toll; LTA: Ácido lipoteicoico.

### Funciones de ligandos agonistas y antagonistas en el uso de fármacos.

Los **TLRs** desempeñan 3 funciones en la **RIC**: 1): detectan la presencia y el tipo de patógeno; 2): generan una respuesta inmediata frente al mismo, y, 3): estimulan el desarrollo de una **RIA**. La detección y el reconocimiento del patógeno son realizados por las CD y los MØ que patrullan al organismo. Las señales de los **TLRs** inician la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales y en las hematopoyéticas circulantes para su llegada a la zona de la infección, con la migración de las CPA hacia los tejidos linfáticos secundarios, y la expresión de B-7 (CD80/86), y del CMH de tipo I y II, e inducen estimulación génica y síntesis de citoquinas y quimioquinas. En los PMN, los **TLR** estimulan la fagocitosis y el efecto microbicida. La **RIC** a un patógeno es decisiva en la regulación de la **RIA** y las CD, son la interfase entre ambas respuestas. Los ligandos para **TLRs** hacen que las CD se conviertan en CPA activas expresando el CD40, el CD80 y el CD86 para activar a los LT. Citoquinas inducidas por los **TLRs** diferencian a los LT a LTCD4<sup>+</sup> Th1, o a LTCD8<sup>+</sup>. La diferente expresión de los **TLRs** en las CPA explica parte de la regulación de las **RIC** y **RIA** por ellos, y permiten desarrollar vacunas y fármacos con ligandos agonistas y antagonistas. Los primeros



se unen a los **TLRs**, y generan una respuesta celular mientras que los segundos, no provocan respuesta, e impiden la unión de los ligandos naturales agonistas. Hay agonistas de los **TLRs**, como adyuvantes en las vacunas, como terapia antimicrobiana, y contra las alergias y el cáncer.<sup>(61-62-63-64-65)</sup> **Agonistas de los TLRs como adyuvantes en las vacunas:** se aprobaron 2 vacunas del HBsAg con el **TLR4** como adyuvante. Los agonistas de los **TLR 3, 4, 7 y 8**, potencian vacunas contra el cáncer e infecciones virales (VIH y HBsAg).

**Agonistas de los TLRs en la terapia de las alergias:** la respuesta exagerada de los **LTCD4-Th2** es un signo de las alergias. Agonistas de los **TLR4** y **TLR9**, que activan la respuesta Th1, inhiben a la Th2. Se estudian para el asma y la rinitis alérgica.

**Agonistas de los TLRs en el tratamiento contra el cáncer:** la capacidad de los **TLRs** de activar **NKC**, **MØ** y monocitos de la **RIC**, que reconozcan células tumorales se usan en terapias anticancerosas. La lisis de las células tumorales por la **RIC** libera antígenos que activan a los **LTCD4-Th1** y **LTCD8+** para la apoptosis de las células tumorales que expresen esos **TLRs**. Se logró la apoptosis en células de leucemia linfocítica crónica **TLR9** positivas y en células del carcinoma mamario con el **TLR3**.

**Agonistas de los TLRs en terapias antimicrobianas:** aquellos para **TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9**, mostraron actividad anti-viral, con la producción de **INF α/β**, y la activación de las **NKC** y de los **LTCD8+**. El agonista para **TLR7** o “**imiquimod**” está aprobado para tratar infecciones por el virus del papiloma humano.

**Antagonistas de los TLRs:** son análogos estructurales de los agonistas que se unen al receptor, pero que **no** inducen ninguna señal. Hay anticuerpos específicos para **TLRs** y moléculas antagonistas escogidas de una biblioteca de compuestos, para las enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas.<sup>(66-67-68-69-70)</sup>

**Los antagonistas del TLR4 para las sepsis inhibirían el reconocimiento de los LPS**, por el **TLR4** evitando la respuesta inflamatoria. Hay antagonistas para evitar el descenso de los **LTCD4+** en la infección por **VIH**, pues los **TLRs** están implicados. Los ligandos endógenos para los **TLRs**, excepto **TLR5** y el **TLR10**, vienen de células en apoptosis. El daño tisular produce altos niveles de estos ligandos que son adyuvantes para los **LB** y **LT** autorreactivos. Pacientes con **LES** tienen leucocitos en sangre con **INF-α** y genes activados por él, que se correlacionan con el estado de la enfermedad; el exceso de **INF-α** se debe a las **CD** plasmocitoides activas vía los **TLR7** o **TLR9**, durante virosis que la agravarían.<sup>(71-72-73-74-75-76-</sup>

<sup>77)</sup> **Receptores NRL:** (the Nucleotide-binding oligomerization domain like-Receptors and Leucin-rich repeat). La atención de los **PAMPs** se ha centrado en la familia **TLR** que son proteínas de la membrana o de estructuras endosómicas. Pero, otra familia de **PRR** citosólicos detectan patógenos que penetran en la célula o inyectan sus productos en ella, o de material de aberraciones metabólicas, como los cristales de ácido úrico, que regulan la inflamación y la apoptosis. Estos receptores intracelulares son las proteínas **NBD-LRR**, que a diferencia de los **TLR**, carecen de **TIR** y poseen una estructura de 3 dominios. Ellos son: un dominio de acoplamiento nucleotídico (**NBD**) muy conservado, o **NACHT**, esencial para la oligomerización de la molécula, más un dominio C-terminal con secuencias de leucina (**LRR**) como las de los **TLR**, y que reconocen al ligando. El tercero, N-terminal, puede ser **CARD** (dominio de reclutamiento de caspasa o familia **NRLC**) o **PYD** (pirinas de la familia **NRLP** o **BIR** (repetición IAP de Baculovirus), para cada una de las clases de la familia **NOD** e **IPAF**, **NALP** o **NAIP**. La molécula conformada por las **NRL**, asociada al adaptador **ASC** (apoptosis-associated speck-like protein containing a **CARD**) forma un complejo llamado inflammasoma. Su efectora es la cisteína-proteasa, caspasa-1, que activa la



secreción de las IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33. Esta caspasa, a diferencia de las caspasas 3, 8 y 9, no se relaciona con los procesos de apoptosis, pero, es crítica en la inflamación. Esta familia es similar al grupo Nod 1 y Nod 2, las **BD-LRR** o «receptores tipo NOD» o **NRL** o **CATERPILLER**.

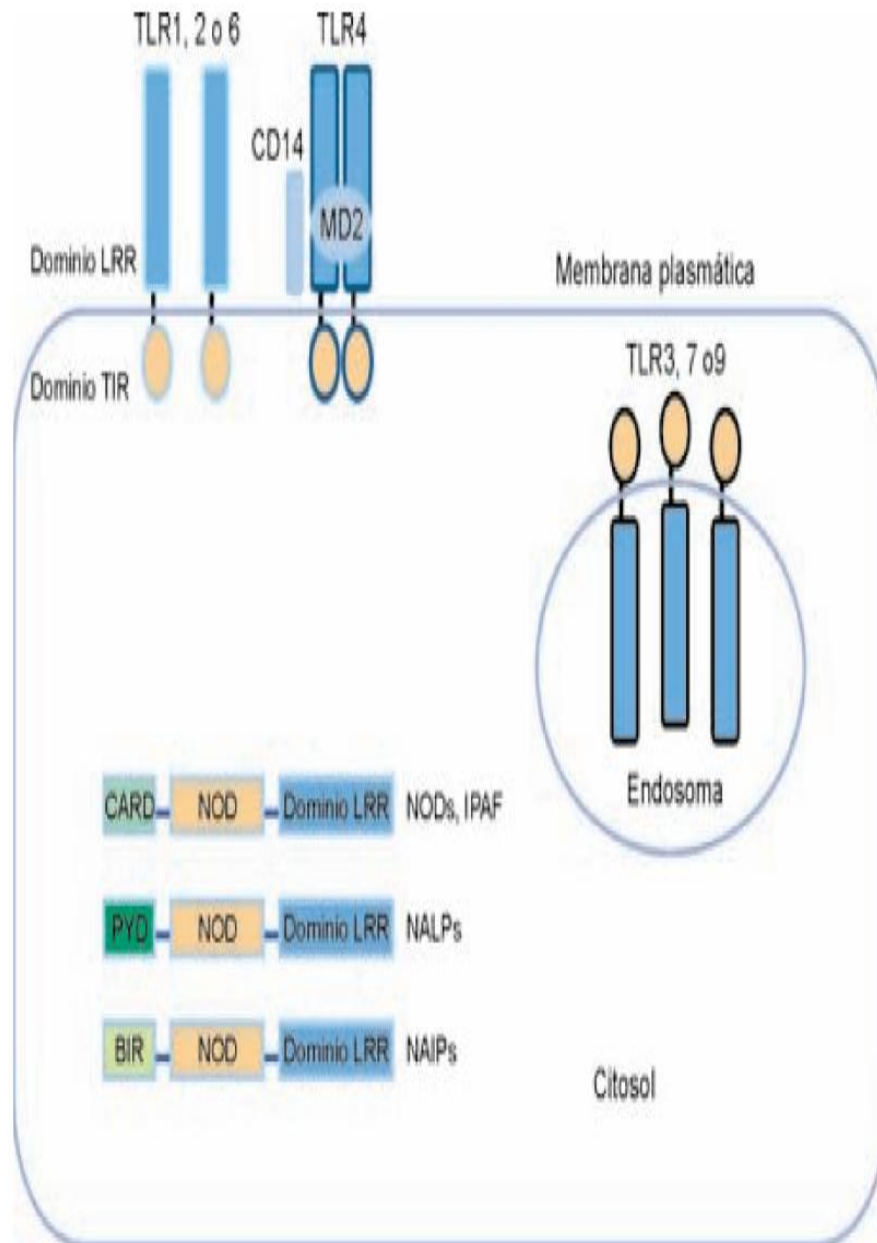


Fig. 8: Las 2 superfamilias de LRR. Los TLR son glicoproteínas de tipo I, ubicadas en la membrana o en los endosomas. El TLR4, reconoce LPS bacteriano, y dimeriza con proteínas acopladoras (CD14, MD2). Los TIR son citofílicos y los NOD (NLR) citosólicos, sin membranas, oligomerizan.

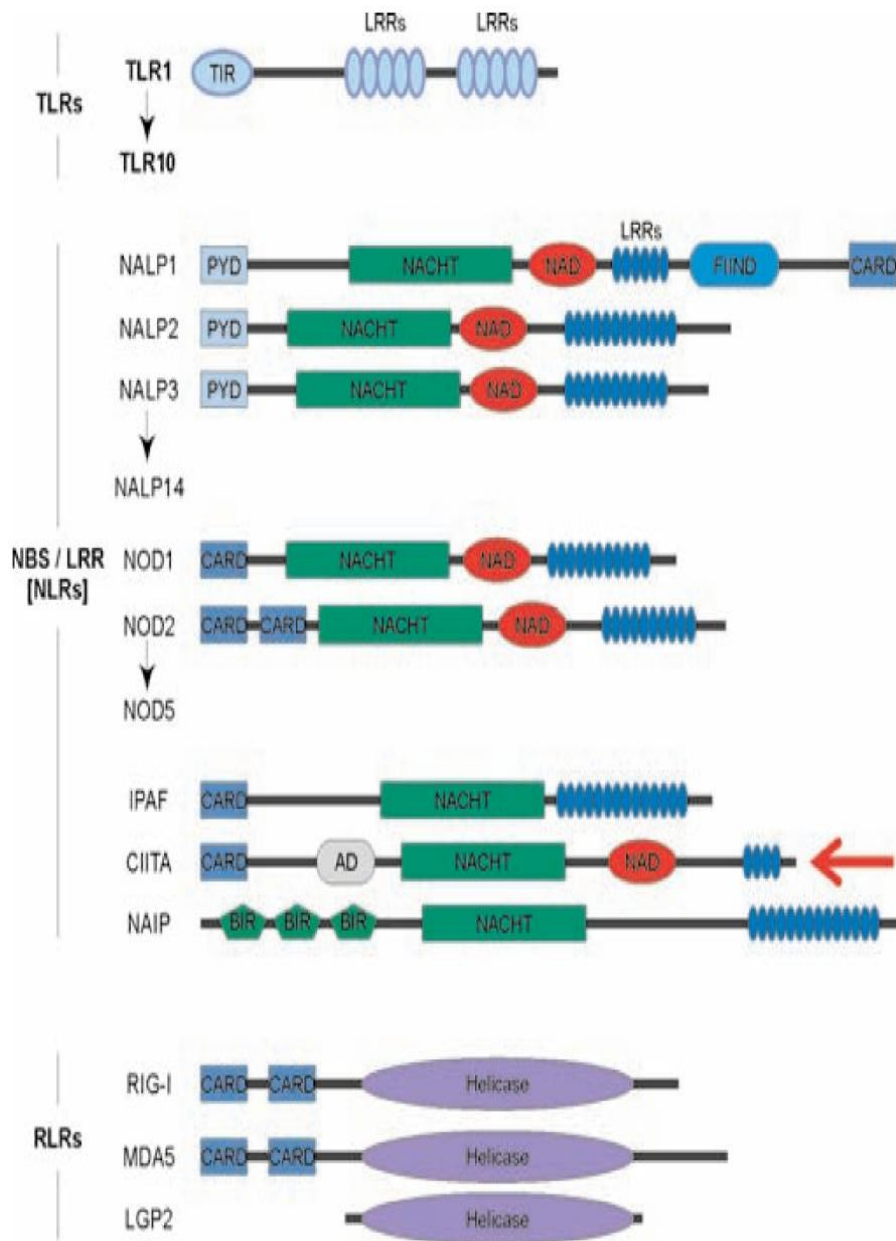


Fig. 9: Esquema de los PRR. Son 3 familias: TLR, NLR y RLR. Los 10 TLR identificados son homogéneos, diferenciándose por su dominio N-terminal (LRR). Los NLR poseen 3 subconjuntos: NALP, NOD y NAIP / IPAF, con 3 dominios, 2 similares —dominio N-terminal LRR y dominio de oligomerización (NAD) y uno C-terminal (PYD, CARD o BIR). NALP e IPAF son similares y se relaciona IPAF con NAIP. Los RIG con un dominio CARD, uno helicasa sin NAD carecen del N-terminal LRR.

### Receptores tipo NOD (NLR).

Los patógenos que llegan al citosol por ser invasivos, escapar del fagosoma, o estar en vacuolas que secretan productos, activan a los **NLR**. Estos detectan a un **PAMP** similar o complementario al reconocido por el **TLR**. El peptidoglicano (PGN) es reconocido por **NOD1/NOD2**; el **IPAF** y la proteína neuronal inhibidora de apoptosis (**NAIP**) reconocen a la

flagelina y la subfamilia **NALP** al muramildipéptido(MDP) y a los adenovirus. **NOD1** y **NOD2** se unen por **CARD** a la protein-quinasa RIP2 (RICK), que recluta a IRAK2, TRAF6, TAB2 y TAK1 para activar al complejo IKK y expresar genes por el NFκB. Los IPAF y NALP1-3 controlan la secreción de las IL-1β e IL-18, por la caspasa 1 y la **CARD (ASC)** o inflammasoma. Los **NLR** son 20 miembros, que se estudiaron con los patógenos respiratorios. Los MØ murinos, las células epiteliales alveolares y los MØ alveolares humanos controlan la división de Legionella pneumophila por un efecto dependiente de **NAIP5** e **IPAF**, pero independiente del **TLR5**, que reconoce a la flagelina. Streptococcus pneumoniae resiste a su eliminación por los PMN, pero es eliminado en la coinfección con Haemophilus influenzae, que es dependiente de **NOD1** e independiente del estallido respiratorio, mientras la neumolisina crea poros que facilitan la entrada del Haemophilus. **NOD1** reconoce a éste último y activa la eliminación del neumococo. **NOD2** es útil contra el Mycobacterium tuberculosis en los ratones, sin establecer la asociación entre las variantes de **NOD2** y enfermedad. La IL-1β, en la respuesta a los **NLR**, elimina a Mycobacterium kansasii y Mycobacterium tuberculosis en los ratones. El aerosol de MDP (ligandode **NOD2**) a cobayos activa a los MØ alveolares que producen ON. Las células epiteliales alveolares secretan citoquinas en respuesta a agonistas de **TLR2**, **TLR4**, **NOD1** y **NOD2**. Este último, activa a las β-defensinas en las células epiteliales humanas.<sup>(78-79-80-81-82-83-84-85)</sup>.

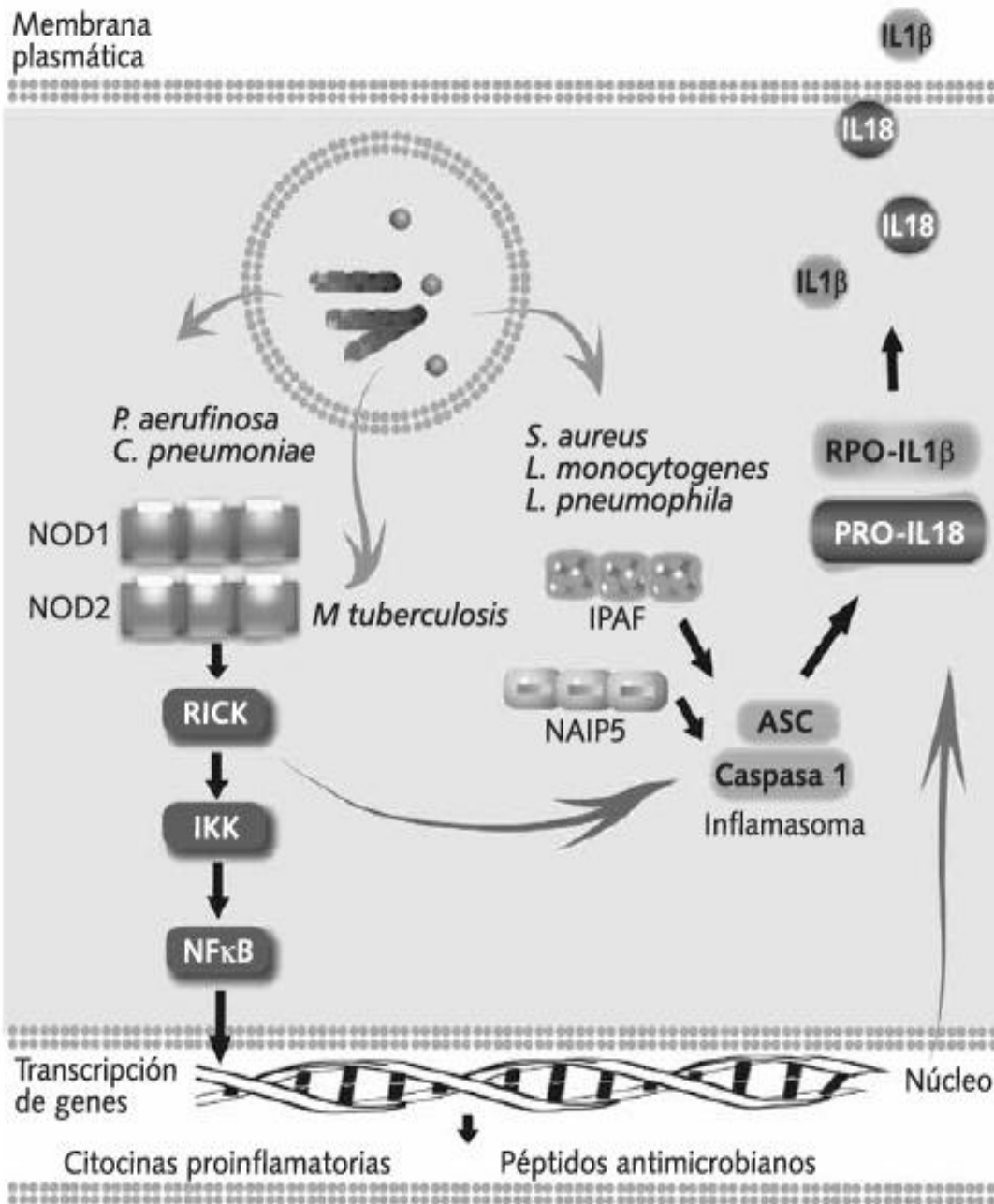


Fig. 10: Los NOD reconocen patógenos respiratorios. Los que llegan al citosol son detectados por los NLR. Los NOD1 y NOD2 generan citoquinas y PAN, mientras que IPAF y NAIP forman un complejo con ASC y caspasa1 (inflammasoma) para sintetizar a las IL-1β e IL-18.

Tabla II. Receptores de la RIC de localización citoplásmica y sus ligandos.

Receptor	Ligando	Distribución celular	Patógenos reconocidos
Receptores tipo NOD (NLR)			
NOD1	Ácido diaminopimélico (DAP)	Monocitos, macrófagos, neutrófilos células dendríticas, células epiteliales y fibroblastos	<i>P. aeruginosa</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>
NOD2	Muramildipéptido (MDP)	Monocitos, células cebadas, células dendríticas	<i>M. tuberculosis</i> <i>L. monocytogenes</i>
IPAF	Flagelina	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B	<i>L. pneumophila</i>
NALPs	MDP, ATP extracelular, cristales de ácido úrico, RNA bacteriano	Monocitos, células dendríticas y células T y B	
NAIP	Flagelina	Macrófagos	<i>L. pneumophila</i>
Helicasas tipo RIG (RLH)			
RIG-I MDA5	RNA de doble cadena	Células dendríticas convencionales	Virus sincicial respiratorio Virus parainfluenza Virus de influenza Coronavirus

### Capítulo 3.

#### Inflamasomas.

La inflamación es un proceso fisiológico para el control de las infecciones y la reparación de los tejidos. Sus mecanismos son inmunopatológicos que alteran funciones vitales. Por eso, el proceso debe ser controlado por la IL-1 $\beta$ , y complejos multiproteicos citoplasmáticos llamados inflamasomas. Estos son parte de la **RIC**, y generan la **RIA**. El inflamasoma son proteínas del inicio de la inflamación por estímulo intracelular, que en condiciones normales, inhabilita las señales de peligro que alteran la homeostasis. El inflamasoma es un oligómero multiproteico de la caspasa 1, PYCARD, NALP, y, a veces la caspasa 5. La proteína **NLR**, que lo definió en humanos, fue la **NLRP1**; luego, vinieron los inflamasomas **NLRP3**, o *criopirina*, y el **NLRP4**, que por un sistema de secreción bacteriano forma poros en la membrana celular. La activación de la caspasa-1 por los inflamasomas, lleva a la secreción de la IL-1 $\beta$ , y con la muerte celular por piroptosis. El inflamasoma asocia mutaciones en los genes de las proteínas **NLR**, como en el vitíligo (mutación en **NLR1**), síndrome Muckle-Wells (mutación en **NLR3**), la enfermedad de Crohn, la gota, la asbestosis y la enfermedad de Alzheimer. Habría una relación entre inflamasomas y la obesidad y la diabetes del tipo 2. Se destacan las criopirinas en las fiebres hereditarias, con inflamación localizada severa, sin relación con un agente infeccioso o tumoral, de duración variable, separados por intervalos libres de síntomas, y por trastornos de la **RIC**. Los M $\emptyset$  y los PMN contienen el inflamasoma. Dos tipos se conocen bien: el **NLRP1** y el **NLRP3** o criopirina. Esta da lugar a la activación de la IL-1 $\beta$  que es secretada por el M $\emptyset$ .

**Caracterización de los inflamasomas y de la familia de la IL-1:** esta familia es proinflamatoria, induciendo fiebre, cambios vasculares, alteraciones en la presión y el flujo sanguíneos, y la activación del endotelio. Es producida por los M $\emptyset$ , los PMN, las CD, las células endoteliales y epiteliales. Aparece en el citoplasma como forma inactiva, y es procesada por la cisteín-proteasa caspasa-1. Las caspasas se clasifican en 3 grupos: las

iniciadoras, las verdugo y las inflamatorias, (caspasa-1), producidas como formas inactivas con un paso autocatalítico, por el ensamblaje de los inflamomas. Se han identificado 4 inflamomas: 3 de ellos contienen **NLR** (**NLRP1**, **NLRP3** y **NLRC4**), mientras que el cuarto corresponde a **AIM-2**, que es una proteína **ALR** (AIM-2-like receptor), con un dominio pyrin y un dominio HIN-200 (por hematopoyético, interferón y nuclear), que se rebautizan como PYHIN. Se estudian 2 nuevos inflamomas, los **NLRP6** y **NLRP12**. Los 4 inflamomas requieren **ASC** para activar la caspasa-1. Las IL-1 $\beta$  e IL-18 requieren la activación de uno de los 4 inflamomas; sin embargo, otros mecanismos como las serin-proteasas de los PMN (proteínasa 3), elastasa y catepsina-G, o las proteasas granzima-A y quimasa de los mastocitos, que también activan citoquinas. El inflamoma más conocido es el **NLRP3**, que recluta a la proteína **ASC**, que acciona con la procaspasa-1 inactiva, a través de **CARD**. Por fin, la caspasa-1 activada madura a pro-IL-1 $\beta$  y a pro-IL-18, para obtener las IL-1 $\beta$  e IL-18. (86-87-88-89-90-91-92-93-94-95-96-97-98-99).

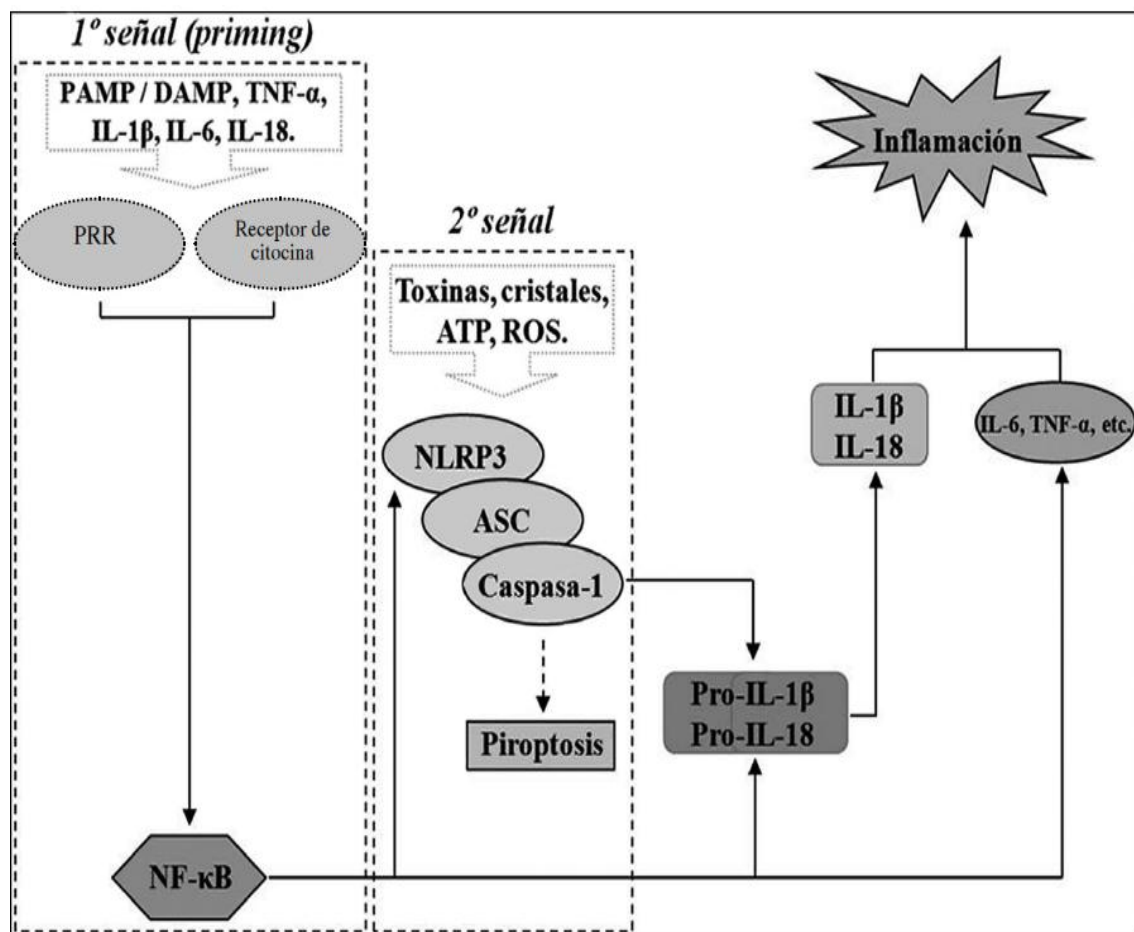


Fig. 11: Activación del inflammasoma NLRP3. Los PAMP o peligro (DAMP), y las FNT- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, estimulan al NF- $\kappa$ B, que es la primera señal para el inflammasoma NLRP3. La segunda señal, es el complejo NLRP3/ASC/Pro-caspasa-1, para activar la caspasa-1, y la proteólisis de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, en las IL-1 $\beta$  e IL-18.

La activación del inflammasoma NLRP3, requiere 2 señales: la primera o preestimuladora, las células son activadas por un **PRR** o un receptor de citoquinas, que activa al NF-κB, necesario para la expresión de **NLRP3**, pro-IL-1β y pro-IL-18. La segunda señal, típica del inflammasoma NLRP3, son los microorganismos, sus toxinas, el LPS y los ácidos nucleicos, o señales endógenas como el ATP, el β-amiloide, los cristales de urato monosódico u oxalato de calcio, y, el asbesto, el sílice y el aluminio de los adyuvantes y residuos de las necrosis. Hay 2 modelos: uno aboga que los activadores del **NLRP3** hacen daño lisosomal, liberando catepsinas B y L, que lo activan, dependiendo del pH ácido, que se vio con inhibidores de la catepsina B (CA-074-metil éster) y la acidificación lisosomal (bafilomicina), con síntesis de IL-1β, en respuesta a activadores específicos. El otro, se basa en que las ROS, son detectadas directa o indirectamente por el inflammasoma NLRP3, con la proteína TXNIP (proteína de interacción con tioredoxina). El flujo de K<sup>+</sup> y su concentración intracelular, inducen la activación de inflammasoma NLRP3.<sup>(100-101-102-103-104-105)</sup>.

**Cascada inflamatoria:** como el apoptosoma, que activa la apoptosis, el inflammasoma activa esta cascada inflamatoria; se une a la pro-caspasa-1, ya sea por la caspasa o a través de **ASC**, se unen la p45-pro-caspasa-1, induciendo su catálisis en subunidades p20 y p10, que se ensamblan, así, la señal inicial con la proteólisis de la pro-IL-1β en Asp116 más IL-1, la escisión del pro-IL-18 en IL-18, la secreción de INF-α/β, la activación de las NKC, la escisión e inactivación de la IL-33, la fragmentación del ADN, la formación de poros, la inhibición de las enzimas glucolíticas, la activación de la biosíntesis de lípidos y la secreción de mediadores de la reparación, como la pro-IL-1α. Además, **AIM2** con su HIN200 detecta ADN de doble cadena, se une al citoplasma y activa al NF-κB, en la infección bacteriana y viral.

#### **Inflamasomas y subconjuntos NLR.**

**NLRP1, NLRP3 y NLRC4** de la familia **NLR** tienen 2 características comunes: la primera es un dominio de unión a ribonucleótido-fosfatos para la auto-oligomerización, y la segunda es una leucina C-terminal, que es un ligando de reconocimiento para receptores o patógenos.<sup>(106-107-108)</sup> **NLRP1:** tiene en su extremo N-terminal un dominio pirina y en el C-terminal un motivo fiind. Tras la activación, la parte C-terminal interactúa con la procaspasa-1 o procaspasa-5, mientras que la N-terminal de PYD interactúa con la PYD o la proteína **ASC**, que recluta otra pro-caspasa-1. El inflammasoma de NALP1 se compone de NALP1, caspasa-1, caspasa-5 y la adaptadora **ASC**. La NALP1 recluta a caspasa-5 a través de CARD en su extremo C-terminal. **Patógenos o moléculas que activan al inflammasoma de NALP1.** El MDP vía NOD2 ensambla el inflammasoma de NALP1. El NOD2 con 2 dominios CARD en su extremo N-terminal interactúa con la pro-caspasa-1 y NALP1, y activa a este inflammasoma. Ocurre en 2 pasos, primero MDP se une a NALP1, con un cambio conformacional en NALP1, la unión de NTP, y luego con la oligomerización de NALP1 se activa la caspasa-1. Un estímulo que lleva al inflammasoma de NALP1, es la toxina letal (TL), del Bacillus anthracis, que sólo se demostró para la NALP1b murina. La activación de la caspasa-1 lleva a la piroptosis, y los MØ susceptibles a la TL con una mutante nula en la expresión de la caspasa-1, son resistentes a la TL. La caspasa-1 es regulada por las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y BCLXL, que se unen a NALP1 por sus dominios LRRs



con una conformación inactiva, que suprime la activación de NALP1. Esta asociación inhibe la unión de NALP1 con **ASC** a través del PYD útil para el inflammasoma, que lleva a la síntesis de la IL-1 $\beta$ .<sup>(109-110-111)</sup>.(Fig. 11-1).

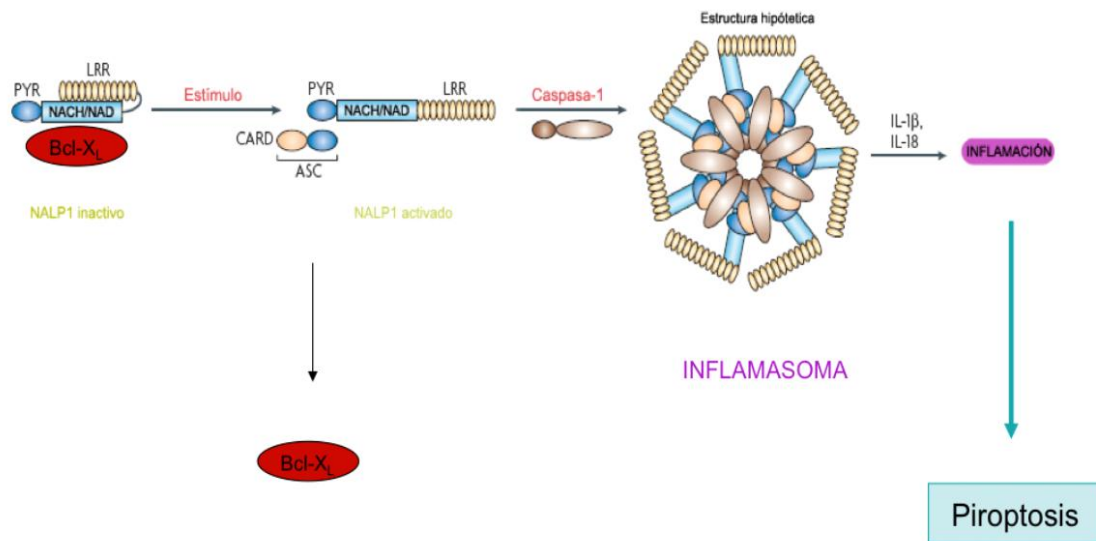
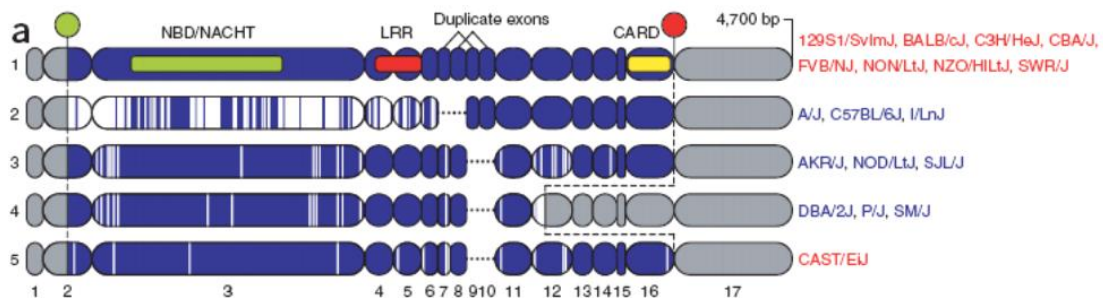


Fig. 11-1: Formación del inflammasoma de NALP1. Siendo inactivo, se une a Bcl-X<sub>L</sub>. Si la célula es estimulada por un PAMP o DAMP, Bcl-X<sub>L</sub> libera a NALP1, y se unen ASC y caspasa-1, activados y segregan IL-1 $\beta$  e IL-18, para la inflamación o la piroptosis.

**Activación:** Reed aboga por 2 etapas, una es la activación por ligandos microbianos, seguido por la unión de un rNTP para el dominio de unión a nucleótidos del **NLRP1**. La sensibilidad de los M $\phi$  ante la TL, apoya el papel de las toxinas en el inflammasoma.

**Bacillus anthracis:** es una bacteria Gram-negativa causante del ántrax que utiliza los mecanismos de defensa, en particular del M $\phi$ . El ántrax tiene 3 formas: 1) la cutánea, o infección local, con pústulas indoloras, edematosas y ulcerosas que dan costras negras; la curación es de 99%, para los tratados con antibióticos; 2) la gastrointestinal, por alimentos contaminados con las esporas, sufriendo náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea hemorrágica e inflamación de los ganglios linfáticos mesentéricos, cuya mortalidad excede el 50%, y, 3) la inhalatoria, más rara, donde se inhalan las esporas, que son fagocitadas por los M $\phi$  alveolares, que germinan en el fagosoma, y van a los ganglios linfáticos regionales, donde las bacterias se multiplican, y generan una septicemia con un shock séptico mortal. Tres proteínas son patogénicas: el antígeno protector (AP), el factor edemático (FE), y el factor letal (FL). El AP (de 753 aminoácidos) facilita la entrada al citosol del FE y el FL depende de éste. El AP tiene 4 dominios: el 1, (residuos 1-258) es el fragmento proteolítico principal, PA20 (residuos 1-167), y el sitio de unión al FL y al FE (residuos 168-258), el corte proteolítico es necesario para su actividad; el 2, forma el heptámero de moléculas PA63 (pre-poro) y la inserción a la membrana; el 3, por su proximidad al 1 realiza la unión del FE y el FL, y, el extremo C-terminal de la molécula, con el dominio 4 (residuos 596-735), se une a la célula. Hay 5 regiones de homología entre el extremo N-terminal del FE y el extremo N-terminal del FL, donde se une al AP. Esta unión al AP, genera 2 toxinas, la edemática (TE) y la letal (TL). El AP más el FE forman la

TE, en tanto que el AP y el FL forman la TL que es formadora de poros y responsable de la enfermedad. La entrada de estas toxinas es por la unión del AP a su receptor TEM8 (Tumor Endotelial Marker 8) y co-receptor CMG2 (CapillaryMorphogenesis Genen2), donde AP sufre proteólisis en los residuos 164-167. Sin el AP20 del extremo N-terminal de AP se forman oligómeros, y cada uno con 7 moléculas de AP63 (pre-poro) exponiendo el sitio para FE o FL, y formar las toxinas. Cada AP une a 3 factores, es endocitado, y la acidez del endosoma inserta al pre-poro PA63 en la membrana, formando un canal conductor de iones, que lleva el FL o el FE al citosol y producen sus efectos. Así, el edema resulta de la actividad de la adenilatociclase inducida por el FE, con Ca<sup>++</sup> y calmodulina, catalizando la producción del AMPc intracelular. En los monocitos, mucho AMPc en respuesta al FE, reduce la IL-6 e inhibe al FNT- $\alpha$ . El FL, una metaloproteasa dependiente de Zn, con especificidad para las MKKs, ejerce proteólisis entre su extremo N-terminal y el dominio catalítico, frenando la activación de las MAP-quinasas. Los MØ de la cepa C3H/HeN son sensibles a la citólisis por el FL, mientras que los MØ A/J son resistentes. Las células J774 derivadas de BALB/cJ son susceptibles a la citólisis por el FL, pero las células IC-21 de C57BL/6J son resistentes. La susceptibilidad o resistencia se atribuyen al gen Nalp1b, pues la secuencia del ADNc de Nalp1b de 18 cepas de ratones mostró 5 alelos polimórficos que se correlacionan con la susceptibilidad a la TL. (112-113-114-115-116-117-



118).

Fig. 11-2: Alelos del gen NALP1b. Los óvalos representan los exones, las áreas azules son los ORF, el círculo verde indica el codón inicial. El círculo rojo es el codón de paro. Las áreas grises son zonas sin transcribir, las blancas son polimorfismos del alelo 1. En rojo están las cepas susceptibles, y en azul las resistentes a la TL.

### Eventos importantes en la muerte inducida por la TL.

La lisis del MØ, necesita de un inflammasoma y de las quinasas activadoras de las MKKs. Los susceptibles a la TL con una mutante de MKK6, que no es susceptible a la TL, son resistentes, por ello es esencial la MKK6 para la supervivencia del MØ. Como la MKK6 activa a la MAP-quinasa p38, y ésta fosforila múltiples sustratos, sería importante en la resistencia a la TL. Componentes de bacterias regulan la activación de la MAP-quinasa p38, en la activación de MØ susceptibles y resistentes a la TL. La MAP-quinasa p38 activa a la MAPKAP-cinasa-2 (MK2), y p38 fosforila a la proteína de los microtúbulos (tau). La MAP-quinasa p38 fosforila a la fosfolipasa citosólica A2(cPLA2), con un papel en la producción de eicosanoides. La MAP-quinasa p38 activa a los factores de transcripción, incluyendo ATF1, ATF2, MEF2A y MEF2C, Sap-1, Elk-1, NF $\kappa$ B, CHOP/GADD153 Est-1, Myc, HSF-1 y p53; así, generaría supervivencia a la TL en los MØ resistentes. (119-120).

**NLRP3:** tiene un dominio PYD como NLRP1, activa la caspasa-1 con su PYD, recluta ASC y forma un oligómero de 7 NLRP3 con casi 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Activación: su oligomerización es por estímulos, como las concentraciones de  $\text{K}^+$ , los virus de la gripe A, la *Neisseria gonorrhoeae*, las toxinas bacterianas, el cristalizado del colesterol y del urato monosódico que aumentan NLRP3-inducido por la IL-1, que se suprimiría en la aterosclerosis y la gota. El dióxido de titanio y de silicio y el asbesto gatillan al inflamasoma. Las toxinas y la ATP-pannexin-1 facilitan la salida de  $\text{K}^+$  y activan al NLRP3. Fig (12 y 13).

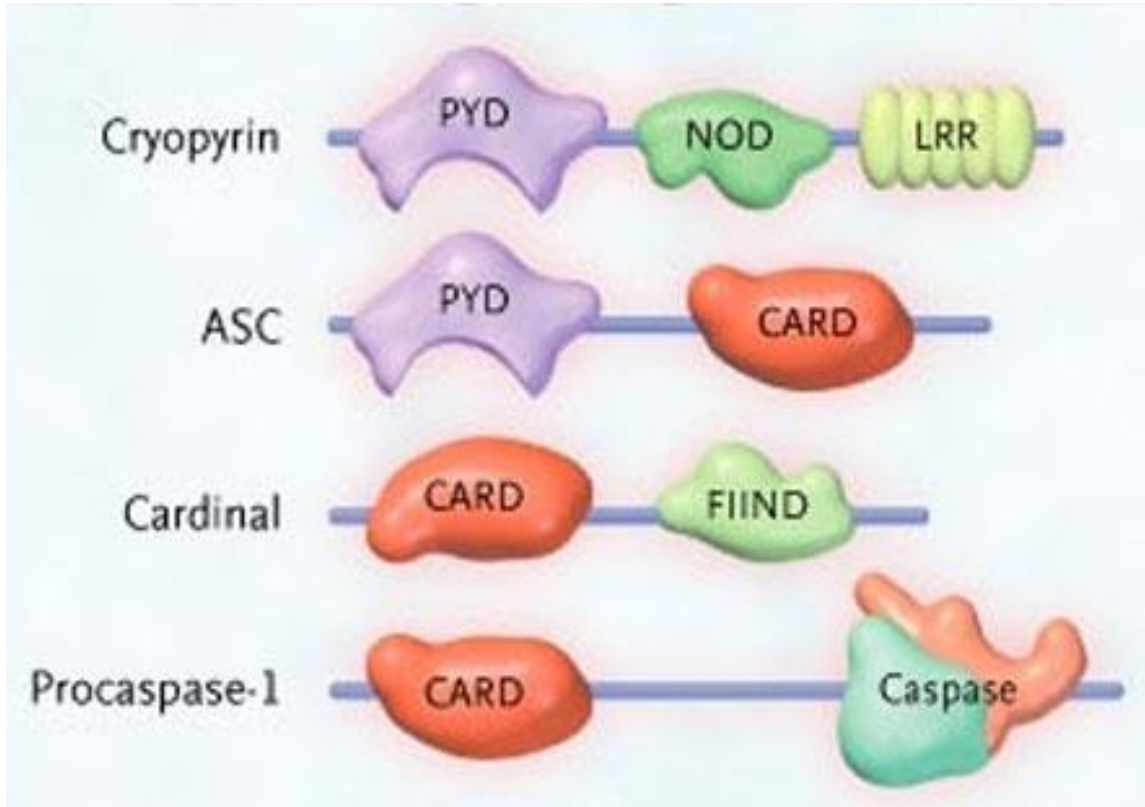


Fig 12

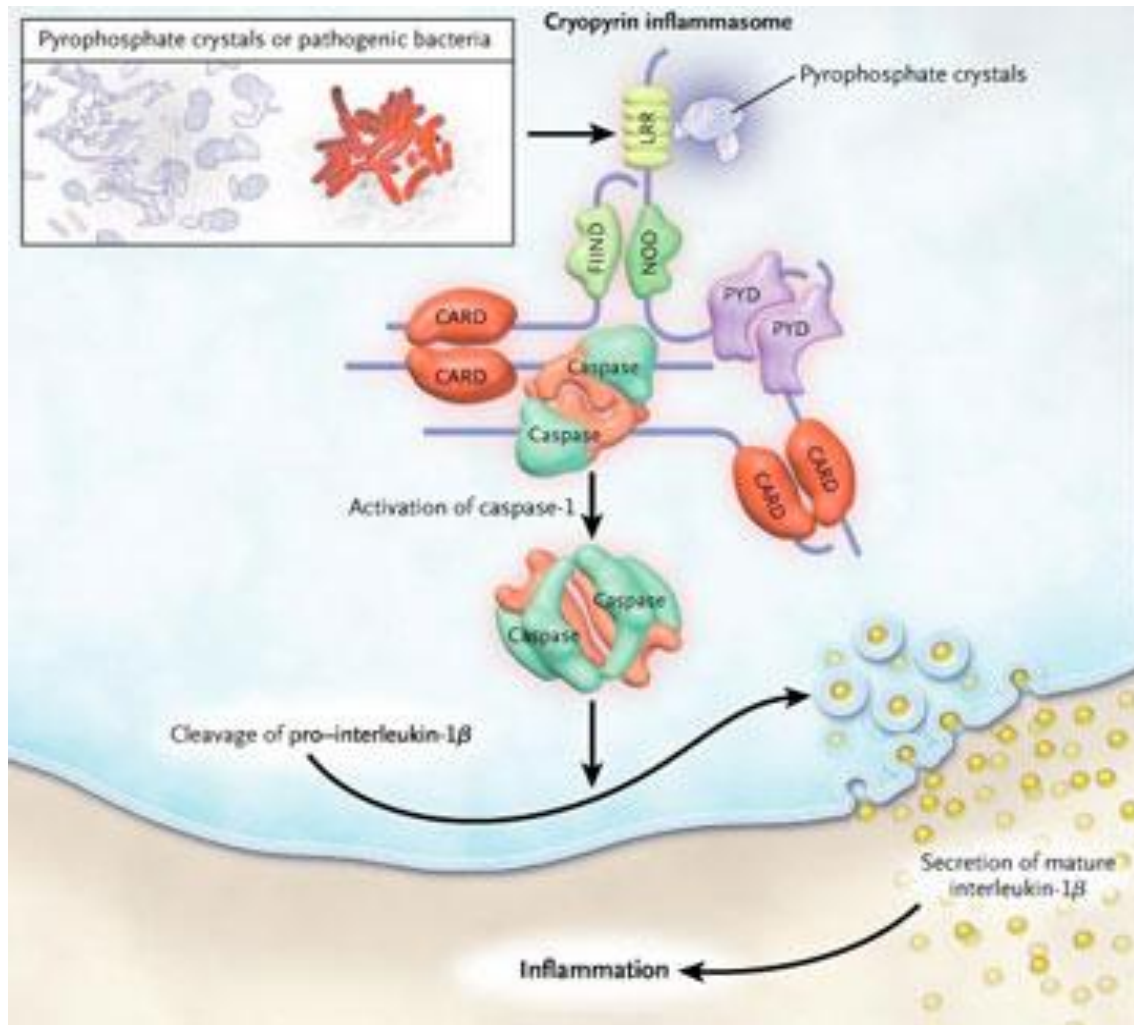


Fig 13

**NLRP4:** es el único subconjunto con un dominio CARD y las NBD y LRR, que recluta procaspasa-1. **Activación:** por *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*. Requiere un tipo 3 ó 4 de la flagelina bacteriana, que entre por la membrana. <sup>(121-122)</sup> **AIM2:** es de la familia no **NLR**. Tiene 343 aminoácidos con un dominio DAPIN N-terminal y un HIN-200 dominio C-terminal, con 2 pliegues de oligonucleótidos de unión. Es un **inflammasoma** que detecta al ADN, y usa un dominio HIN200 unido a un PYD, con el adaptador de **ASC** uniéndose al ADN por su C-terminal. El **ASC** recluta procaspasa-1 en el complejo y la caspasa-1 activa a las citoquinas. <sup>(123-124-125)</sup>

#### **Papel del inflammasoma en las enfermedades infecciosas.**

En la malaria, la IL-1β se asocia con la forma cerebral, por eso la inhibición de la IL-1β sería una terapia útil. El **inflammasoma NLRP3** es activado por el varicela-zóster, y por la proteína de la matriz del influenza. El ADN del adenovirus tipo 5 activa la pro-IL-1β en los MØ dependiendo del **NLRP3** y de **ASC**, mientras la proteína VI rompe la membrana lisosomal y libera la cathepsina B y ROS. Lo mismo ocurre con la M2, tanto en CD como en

MØ, y en bacterias como *Aeromonas* spp., *Borrelia* spp., y *Chlamydia trachomatis*, que activan a las IL-1β e IL-18, y, regulan la IL-17 y el INF-γ. La *Salmonella typhimurium*, la *Legionella pneumophila* y la *Burkholderia thailandensis* se detectan por el inflammasoma NLRC4, que se activa por la flagelina. *Listeria* spp., estimula los inflammasomas NLRP1, NLRP3 y **AIM-2**, por la síntesis de la IL-1β. El *Schistosoma mansoni*, afecta la señalización a través de los **TLR**, disminuyendo la señal para el inflammasoma NLRP3 y, la síntesis de IL-1β. Autores como Thirumala-Devi Kanneganti, Fabio Martinon y Sanjeev Mariathasan, en ratones, donde la criopirina de los MØ era activada, vieron que los deficientes en ella la secreción de la IL-1β funcional estaba reducida. El urato monosódico (de la gota) y el pirofosfato de calcio dihidratado (de la pseudogota) se detectan por el inflammasoma-criopirina, el que activa la IL-1β. MØ de ratones deficientes en procaspasa-1, no producen IL-1β en respuesta a los cristales de urato. La criopirina se activa por el **LRR** con urato o pirofosfato de calcio dihidratado, y la liberación de la caspasa-1 activa a la IL-1β desde la pro-IL-1β. El síndrome de fiebre hereditaria posee una criopirina hiperactiva, que genera la IL-1β. La anakinra, un antagonista del IL-1R, mejora los síntomas.<sup>(126-127)</sup>.

### **Inflammasoma NLRP3 y el VIH-1.**

Hay muy poca evidencia entre el inflammasoma NLRP3 con el VIH-1, incluyendo la asociación entre polimorfismos del extremo 3' no codificante (3'UTR) de **NLRP3**, con el VIH-1. Su genoma son 2 moléculas de ARN, que por la transcriptasa reversa, se convierte en una molécula de cADN, que son activadores del inflammasoma NLRP3 (ARN y ADN). El VIH-1 es reconocido por 2 tipos de receptores de la **RIC**, los **TLR** (TLR7/8) y los **RLR** (receptores tipo ARN helicasa); aunque el reconocimiento se daría por otros **PRR**, incluyendo **TLR-2, TLR3, TLR-4, TLR-9, AIM-2**, y algunos **NLR**. La señalización activada inicia una respuesta mediada por los INFs tipo I. Hay aumento sérico de las IL-1β e IL-18, que alteran la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular. Se asoció a estas citoquinas con miocarditis y enfermedad coronaria, en infectados por VIH-1, con actividad del inflammasoma NLRP3. El VIH-1 activa al inflammasoma NLRP3 en los MØ humanos, expresa la IL-1β, y las señales para el NF-κB.<sup>(128-129-130-131)</sup>.

### **Regulación del inflammasoma NLRP3.**

Hay una regulación negativa por el CD40L (de los LT), para inactivar el inflammasoma NLRP3 en los MØ. La proteína YopK de *Yersinia* spp., y la metaloproteasa ZMP1 (zinc-metaloproteasa-1) del *Mycobacterium tuberculosis*, bloquean al inflammasoma NLRP3, y aseguran supervivencia. La proteína viral Orf63 del KSHV (o sarcoma de Kaposi), como homólogo viral del **NLRP1**, bloquea a los inflammasomas NLRP1 y **NLRP3**, favoreciendo la reactivación viral. Genes con un dominio PYD (pyrin) o CARD son señuelos, y suprimen al inflammasoma NLRP3. En el grupo están COP1 (CARD-only protein 1), Iceberg, INCA (inhibitory CARD) y caspasa-12, que poseen CARD, y las proteínas POP (PYD only proteins), con PYD. Los patógenos las imitan, y, los poxvirus, codifican para proteínas vPYD (viral PYDs). Lo regula la inhibición de la caspasa-1, y factores como Flightless-I, el inhibidor de la proteasa 9 (Pi9) y proteínas virales como CrmA (Cowpox-cytokine-response-modifier-A) y p35 (baculovirus).

### **La MAP-quinasa-p38 en el inflammasoma de MØ susceptibles y resistentes a la TL.**

El inflammasoma NLRP1 más la TL, mata a los ratones con el alelo NLRP1b1. Pero, habría que inactivar a la vía de la MAP-quinasa p38 para la muerte de los MØ susceptibles. Si no hay **NLRP1**, la MAP-quinasa p38 no regula ni a la caspasa-1 ni a la IL-1β inducida por la TL en MØ susceptibles. Ocurre si la activación de p38 se da por el **TLR2**, pero no por el

**TLR4.** Pero, la activación de la MAP-quinasa p38 vía **TLR2** o **TLR4** no previene la muerte de los MØ por la TL.

### **El inflammasoma NLRP3 y los adyuvantes de aluminio.**

Se usan en las vacunas de humanos y animales, activando un sistema de **RIC** intracelular, llamado inflammasoma Nalp3 (o criopirina, CIAS1 o NLRP3). Las IL-1 $\beta$  e IL-18 de los MØ, en respuesta al aluminio in vitro, requiere la señal del inflammasoma. Ratones deficientes de **NLRP3**, asociado a la caspasa (**ASC**) o caspasa-1, no sintetizan anticuerpos a un antígeno con aluminio, pero si con adyuvante completo de Freund.

### **Otros receptores.**

#### **1): Receptores de helicasas tipo RIG (RLH ó RLR).**

La proteína inducible por el ácido retinoico I (RIG-I) es una helicasa del ARN. Participa en la transcripción, recombinación y reparación del ADN, y biogénesis ribosomal. Rompe los puentes de H<sup>+</sup> de las bases nitrogenadas, y otras enzimas copian la hebra molde. Se desplazan por los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico, separando las 2 cadenas antiparalelas del mismo (ADN bicatenario, ARN bicatenario o un híbrido ADN-ARN), y con la energía de la hidrólisis del ATP o GTP. Hay muchas helicasas, 14 en E. coli y 24 en los humanos. Poseen varias estructuras y estados de oligomerización. La helicasa tipo ADN-B actúa sobre el ADN como hexámero en forma de rosca, pero otras son monómeros o dímeros, obligando a la horquilla a abrirse, y desenrollarse. Son más rápidas in vivo que in vitro. Reconocen ácidos nucleicos de origen bacteriano o viral; los RIG-1 y MDA5 reconocen ARN, en tanto que DAI y AIM2 reconocen ADN. Los RLH son ARN helicasas, que en su extremo N-terminal poseen un dominio CARD, y en la zona central un dominio con ATPasa para reconocer al ARN y su señalización. En el extremo C-terminal tienen un dominio de unión al ARN de doble cadena o ARN-5'-trifosfato, que conduce a una respuesta anti-viral, por el INF- $\beta$ , que activa al factor IRF3 y la traslocación del NF $\kappa$ B al núcleo, bloqueando la replicación viral. El helicard, o proteína del gen de la diferenciación del melanoma 5 (MDA5), posee un dominio de helicasa y 2 dominios CARD. Otro es el LPG2, que no tiene CARD y es un regulador negativo de RIG-I y MDA5. Estos 2, poseen el adaptador mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) que activa al NF $\kappa$ B y a IRF para sintetizar INFs, e inducir la apoptosis celular por la caspasa 9. El MDA5 reconoce ARN, pero RIG-I reconoce ARN pequeño de doble cadena y ARN-5'-trifosfato. Los RLRs detectan a pequeños ARNs, amplificando la respuesta anti-viral de los INFs. El ADN puede ser reconocido por la proteína DAI, mientras que el receptor citosólico de ADN, AIM2 activa a la pro-IL-1 $\beta$ . Kobasa estudió estos receptores en la Macaca fascicularis con una cepa del virus de la influenza de 1918 (i1918), que causaba lesiones de bronquiolitis, bronquitis, edema y exudados hemorrágicos. Los genes de la respuesta inmune, proliferación y remodelación tisular, estaban disminuídos en los infectados con i1918, pero no en los infectados con otra cepa. Los genes que regulan a las quimioquinas y citoquinas se transcriben tardíamente en el grupo de i1918, y los genes de los INFs están a la baja. En los macacos no se transcriben los genes de RIG-I ni MDA-5, por eso la deficiencia en la **RIC**. Los TLR7 y RIG son útiles en las respuestas contra este virus. Los RLH son el blanco del influenza para evadir la respuesta inmune, como la proteína M del coronavirus que bloquea a los RIG-I y MDA5.<sup>(132-133-134-135).</sup>



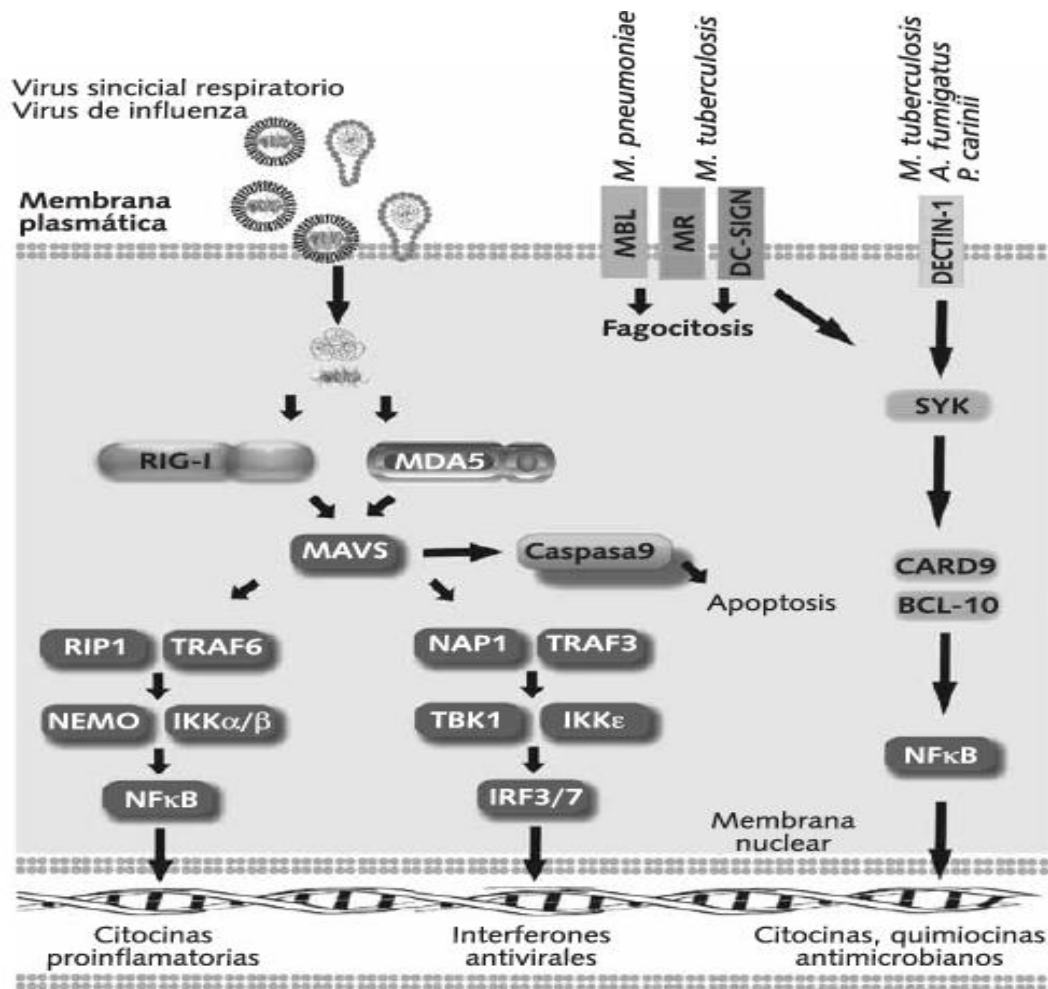


Fig. 14: Receptores de la respuesta pulmonar. Las helicasas de ARN(RLH) RIG-I y MDA5 son responsables de la inmunidad antiviral con los TLR 7/8, y las lectinas tipo C (CLR), reconocen carbohidratos de bacterias y hongos.

## 2): Receptores lectina tipo C (CLR).

Las moléculas de las **RIC** y **RIA** son glicoproteínas como la envoltura viral y la pared bacteriana. Los carbohidratos unidos a proteínas o péptidos se clasifican en N-linked u O-linked oligosacáridos. En el primero, un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) se une a la amina del grupo R de una asparagina, en cambio en el segundo, un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) se une al hidroxilo del grupo R de una serina o treonina. Tienen 3 propiedades: 1): los azúcares dan estabilidad a la proteína, protegiéndola de las proteasas y de las interacciones proteína-proteína, colaborando con las chaperonas; 2): actúan en la transducción de señales, en el desarrollo y la diferenciación celular, y, 3): regiones del oligosacárido tienen epítopos que activan las **RIC** y **RIA**. Los azúcares especie-específicos en las células humanas son puerta de entrada para los patógenos, su adhesión e invasión por medio de lectinas virales y bacterianas (adhesinas, pilis y hemaglutininas). El sistema inmune reconoce a los **PAMPs** a través de los **PRRs**, distribuidos en la **RIC**, como los **Toll**, **DC-SIGN** y el receptor de manosa (**MR**). Los mamíferos utilizan la ausencia del ácido siálico terminal, en la detección de organismos extraños. Esa ausencia impide la unión del factor H, y que el SC los ataque. Algunos patógenos burlan al sistema inmune con **PAMPs** específicos. Así, *Neisseria gonorrhoeae* posee un lipooligosacárido (LOS) que



reconoce asialoglicoproteínas (ASGPR) de los MØ, hepatocitos y células espermáticas, para infectar al tracto reproductivo. Otros, con azúcares análogos al ácido siálico, como el pseudamínico de *Pseudomona* y el legionamínico de *Legionella*, evitan la **RIC** y generan cepas virulentas invasivas. Los **CLR** detectan a la N-acetil-glucosamina, la manosa, la N-acetil-manosamina, y la glucosa. El Reg III, se une al PGN de las Gram-positivas y regula la colonización del intestino murino. La dectina-1 y la No-integrina unida a ICAM-3 específica de las CD (**DC-SIGN**) participan en la fagocitosis, maduración fagosomal, producción de ROS, de RNS, de IL-10 y de derivados del ácido araquidónico. Los CLR son transmembrana con una lectina tipo C (CTLD, C-type-lectin-like domain) que se unen a carbohidratos dependientes de Ca<sup>++</sup> al revés de otras lectinas. El sitio de unión del ligando es el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, carbohydrate-recognition-domain), pero, la identificación de CRD mostró que no todos los CLR unen carbohidratos, e incluso pueden no usar Ca<sup>++</sup>, por lo que se llaman CTLD, que es un motivo de unión a ligandos de más de 1000 proteínas conocidas. CLR son endocíticos, y de señalización, y en función del ligando su señalización podría ser la MAP-quinasa y la activación del NF-κB o indirecto por los TLRs. La secuenciación en los genomas de los vertebrados mostró que son 17 grupos. Los CLR son solubles, como la lectina de unión a manosa (MBL, mannose-binding lectin), las proteínas del surfactante pulmonar A y D (SP-A y SP-D), o proteínas transmembrana que se dividen en 2 grupos por su extremo N-terminal. Las del grupo I lo tienen en el exterior celular con el receptor de manosa (RM o CD206). Las del grupo II son asialoglicoproteínas, con su extremo N-terminal en la célula, y son 2 subfamilias, la DCIR (DC inmunoreceptor), Ca<sup>++</sup> dependiente para unir al ligando, y la de dectin-1 que es Ca<sup>++</sup> independiente. Los CLR detectan patrones de hongos y participan en las **RIC** y **RIA**, como el RM, dectin-1, dectin-2, DC-SIGN e ICAM-3. Los TLR2 y TLR4 reconocen conidias e hifas de *A.fumigatus*, los ratones deficientes en ellos y en MyD88, se defienden del hongo por dectin-1, que va al fagosoma y señala produciendo FNTα y MIP-2. Los tubos germinales y las hifas de *P. jirovecii*, con β-glucano se reconocen por dectin-1, con la producción de citoquinas y ROS para eliminarlos. Con dectin-1 se señala por los ITAM o hemITAM; con dectin 2 se necesita del TLR2, o adaptadores con ITAM, como el RFc-γ y el DAP12. La doble señal precisa la fosforilación de las tirosinas del ITAM por quinasas-Src, lo que une la tirosina-quinasa-SYK por los Src2 (SH2) a las tirosinas fosforiladas y la activación de las MAPK, y los NFAT y NF-κB. Este se activa por el complejo CARD9, Bcl10 y Malt1. Las señales por DC-SIGN y por la quinasa RAF1, son dectin-1 independiente de SYK. Su activación forma ROS del inflammasoma NLRP3. Hay otras CLR cuya función es la fagocitosis, y generar señales al núcleo para la transcripción de genes. La MBL actúa contra *M. pneumoniae*, que no tiene una pared con PGN y no es reconocido por el TLR. El CLR, DC-SIGN y el MR participan en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis*. (Figs. 14 y 15). DC-SIGN y sus 7 secuencias hacen la multimerización del receptor y su cola la internalización. Con el ICAM-3 colabora con las CD y los LT, en la presentación antigénica y la coestimulación. Se expresa en las CD inmaduras y detecta residuos de manosa dependientes de Ca<sup>++</sup>. Actúa en la fagocitosis de *Candida albicans* con la galectina 3 y el TLR2. El TLR activa al NF-κB y la señal de DC-SIGN la acción de la quinasa RAF1, que fosforila al NF-κB en la serina 276-subunidad p65 por su afinidad de unión al ADN y a la transcripción.

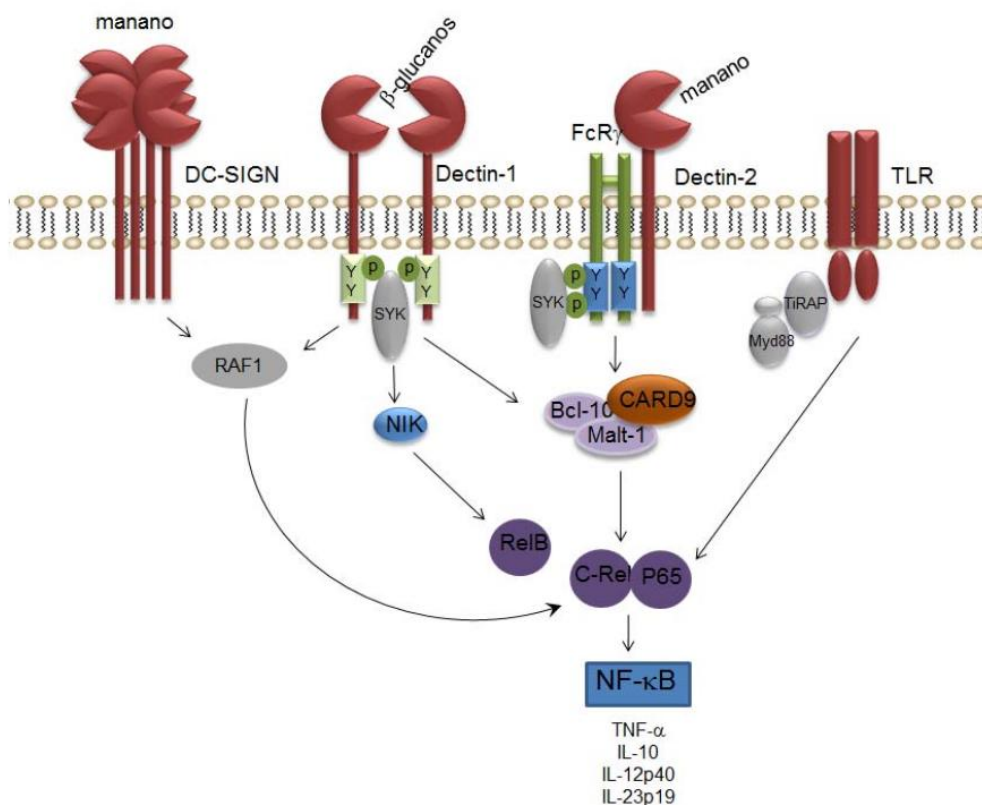


Fig. 15: Vías de señalización de CLR y PRR que activan al NF-κB por patrones de hongos. La activación de SYK y el hemITAM forman el complejo CARD9/Bcl10/Malt-1, que activa la subunidad p65 de NF-κB y de c-Rel y de RelB por la quinasa NIK. La señalización de RAF1 regula la p65 inducida por el TLR. El CARD9 se regula por dectin-2, y RAF1 por DC-SIGN.

Dectin-2, o CLEC6a, precisa del RFcy y DAP12 para reclutar a SYK y activar al NF-κB. La unión del ligando es dependiente de  $Ca^{++}$  y se une a  $\alpha$ -mananos de los hongos, con más capacidad para las hifas que para las levaduras. El MR reconoce de manera dependiente de  $Ca^{++}$  residuos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina. Forma parte de multielectinas que incluyen a Endo-180, DEC-205 y a las fosfolipasas secretadas. Posee 8 CTLD sin motivos des señalización en la cola citoplasmática, y con TLRs y dectin-1, genera citoquinas. Los  $\beta$ -glucanos se usan como inmunomoduladores, antiinfecciosos y anticancerígenos. Son polímeros de monómeros D-glucosa ligados con enlaces glucosídicos de la pared de hongos, plantas y bacterias. No son sintetizados por los animales, y son reconocidos por la **RIC** y sus **PRRs** como **PAMPs**. La Dectina-1 humana (hDectin-1) es un CLR expresado en células mieloides, MØ, CD y PMN, y tiene un 60% de homología con la del ratón (mDectin-1) por las N-glicosilaciones. Los  $\beta$ -glucanos con Dectina-1 activan respuestas por Syk/CARD9, como la fagocitosis, el estallido respiratorio y la secreción de citoquinas. La Dectina-1 es un receptor de glucanos con uniones  $\beta$  (1-3) y (1-6). Los  $\beta$ -glucanos solubles, (laminarina), se unen a la Dectina-1, pero no inician la señalización. Las células con la isoforma B humana se comportan igual que la mDectina-1, mientras que las de la isoforma A responden a partículas y a  $\beta$ -glucanos solubles. La cola con un hemITAM y su ligandodimeriza 2 moléculas de dectin-1 y da un sitio trans de acoplamiento para los 2 dominios SH2 de SYK, recluta a SYK, activa a CARD9, a NIK (NF-κB inducing kinase) y produce ROS. Así,

dectin-1 activa las vías de NF- $\kappa$ B, y el inflammasoma NLRP3. (Fig. 15).

El humano posee 2 isoformas mayoritarias (A y B) y 6 minoritarias (C-H). Las primeras reconocen al ligando y difieren por tener (isoforma A) o no cuello (isoforma B). Se regula positivamente por el GM-CSF, las IL-4 e IL-13, y negativamente por los LPS e IL-10. (Fig. 16).

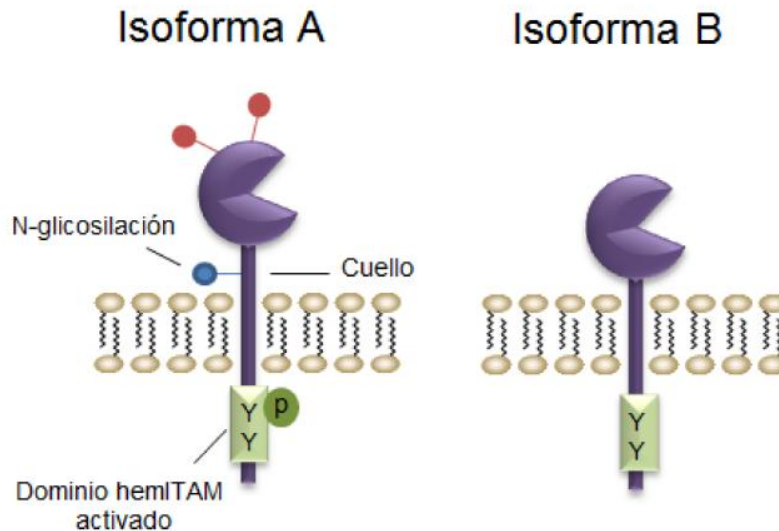


Fig. 16: EL dectin-1 es un receptor transmembrana de tipo II con un CRD separado de la membrana por el cuello (isoforma A). La isoforma B no presenta cuello. El ITAM citoplasmático fosforilado, da la señal intracelular. Dectin-1 hace N-glicosilación en el CRD (rojo=ratón) o en el cuello (azul=humanos).

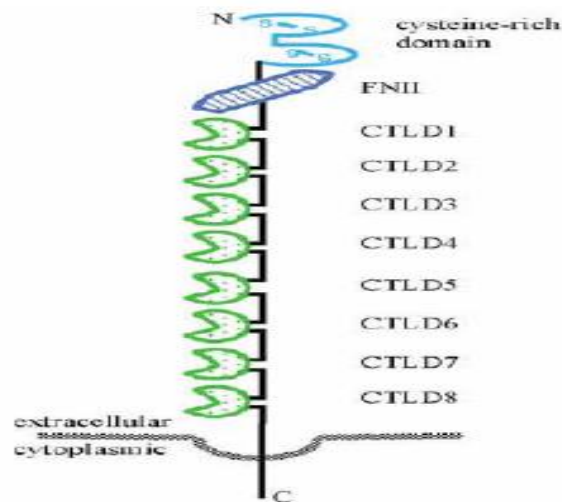
Existe otro CLR o CLE9a que posee un hemITAM con una sola tirosina que señala a través de SYK. Se expresa en las CD, detecta células en apoptosis, en las fases tardías y su ligando es el citoesqueleto de actina. (136-137-138-139-140).

### 3): Receptor de manosa (MR).

Es una proteína transmembrana de 175 kDa, de los MØ, CD, células endoteliales y epiteliales humanas. **MR** posee un motivo CRD, un FNII, 8 CTLDs (del CTLD-4 al 8), un dominio intermembrana y una cola de 45 aminoácidos. Sufre cambios post-traduccionales como N- y O-glicosilaciones. El **MR** une e internaliza glicoproteínas, con residuos de manosa, fucosa y GlcNAc, y enzimas lisosomales, mieloperoxidasas de los PMN, hormonas tiroideas y mucinas, con residuos sulfatados del tipo Lewisx. El **MR** se expresa en las CPAs profesionales de las **RIC** y **RIA**, pues reconoce y fagocita hongos, bacterias, virus y protozoos, que poseen residuos de manosa o GlcNAc. Su reciclaje acumula antígenos manosilados intracelulares, e inicia el procesamiento antigénico y la presentación por el CMH de clase II a los LT. Antígenos tumorales humanos (MUC1) con manan-oxidado dan respuestas Th1, de CTLs y protegen a los ratones frente a los adenocarcinomas. Las bacterias usan al **MR** como una evasión, evitando su ingreso a los lisosomas y el efecto bactericida de la ROS. La expresión de **MR** disminuye por el INF- $\gamma$  y sube por las IL-4, IL-10, IL-13 y la prostaglandina E (PGE). (Fig. 17).

Fig. 17. Los dominios del MR (CTDLs) de lectina tipo C (reconocen manosa); CRD, dominio rico en cisteínas (une azúcares sulfatados); FNII o fibronectina del tipo II (reconoce

colágeno) .



**Tipos:** los humanos tienen 2 tipos de MR, codificados por el gen MRC1, con un loci con el gen MRC1L1, así como LOC340843 y LOC340893. El gen tiene 2 regiones idénticas. Las proteínas recombinantes en levaduras tienen mucha manosa, a diferencia de las células humanas. **Función:** interactúa con la proteína gp120 del VIH, lo que permite su absorción, y le afecta en su unión a los LB por el MRC1, aumentando los MR de la matriz. La proteína Nef del VIH interactúa con MRC1 y regula negativamente los MR de los MØ y las CD. La tat reprime la transcripción de los promotores MRC1 por su regulación negativa. Estas proteínas interactúan con MRC1 y el virus se extiende.

#### 4): Carbohidratos de hemocianinas y su relación con las células tumorales.

Son metalo-glicoproteínas de alto peso molecular, de la hemolinfa de moluscos y artrópodos. Poseen  $\text{Cu}^{++}$  en su estructura, que le permite unir, transportar y liberar oxígeno y monóxido de carbono ( $\text{O}_2$  y  $\text{CO}$ ) durante la respiración. Los sitios de unión al  $\text{O}_2$  poseen 2 átomos de  $\text{Cu}^{++}$  unidos a la proteína por 3 residuos de histidina, que al unirse al  $\text{O}_2$  muestran una unión alostérica. La afinidad por el  $\text{O}_2$  es sensible al pH, temperatura, fuerza iónica, cloruro,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Las hemocianinas de moluscos difieren de las de los artrópodos en su peso, estructura cuaternaria, organización de las subunidades y en la capacidad de unir  $\text{O}_2$ . Al microscopio electrónico son un cilindro hueco, de 35 nm de diámetro y 38 nm de largo, con una estructura básica de 10 subunidades (de 400 kDa) o decámeros. Cada subunidad posee de 7 a 8 unidades funcionales (FUs), de 50 kDa cada una, que se unen covalentemente a pequeñas proteínas (de 10 a 15 aminoácidos) llamadas "linkers". En los gastrópodos y bivalvos, la hemocianina es didecámerica (dos decámeros ensamblados axialmente) dando moléculas de 8 a 9 MDa. Sus subunidades no están unidas covalentemente, y se disocian por el pH y la fuerza iónica. Las hemocianinas de gastrópodos son útiles en biomedicina y en biotecnología, porque son inmunogénicas en los vertebrados y mamíferos, pues con su antigenicidad intrínseca, timo-dependiente activa a los  $\text{LTCD4}^+$ . Son xenogénicas, grandes, con repetitividad de sus epítopos (hasta 60 veces), y un alto porcentaje de azúcares (del 2 al 9%). Hay hemocianinas similares a la KLH, como ser la de *Rapana thomasiana* (RtH) y la de *Concholepas concholepas* (CCH). Si bien KLH y CCH presentan 2 subunidades, en KLH (formada por KLH1 y KLH2) constituyen

homodecámeros que de a pares forman homodidecámeros, sin epítomos comunes y con estabilidad al  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  en su medio. En CCH, las subunidades (CCHA y CCHB) están mezcladas, con epítomos comunes, se organizan como heterodecámeros y heterodidecámeros, sin iones divalentes, con mayor estabilidad frente a KLH. CCH, se usa en biomedicina generando anticuerpos, en la terapia experimental del cáncer de vejiga, y en vacunas. Tanto KLH como CCH estimulan a las NK, con un aumento del  $INF-\gamma$ , e in vitro, activan y maduran a las CD. El mecanismo molecular por el cual KLH y CCH son inmuno-estimulantes, se discute, pero ni el gran tamaño, ni la simetría D5 de las de moluscos son los responsables, ya que las subunidades de CCH o RtH producen igual efecto que el de la proteína completa. La cantidad de monosacáridos es diversa, pero la manosa alcanza la expresión de más de 160% del total. La KLH activa a las CD humanas, in vitro, por el **MR**, que expresan la IL-12, por lo que los residuos de manosa son importantes en la respuesta inmune. El 3% del peso total de CCH son carbohidratos. La subunidad CCHA posee un 3,6% p/p de carbohidratos siendo el 1,2% a N-linked y el 2,4% a O-linked, mientras CCHB tiene un 2,5% p/p de carbohidratos, 2,3% corresponden a N-linked y 0,2% a O-linked oligosacáridos. Un 3% del peso total de KLH son azúcares, y al igual que CCH, la subunidad KLH2, tiene mayor cantidad de O-linked oligosacáridos. Los azúcares de KLH, serológicamente, tienen una reacción cruzada con un N-linked oligosacárido (Fuc (1-3) GalNAc (1-4) [Fuc (1-3)] GlcNAc) del *Schistosoma mansoni*, permitiendo su diagnóstico por medio del ELISA. Las células tumorales transforman su funcionamiento en glicosilaciones aberrantes de proteínas y lípidos de la membrana, con un aumento o disminución de los N- u O-linked oligosacáridos. Las N-linked (ricas en manosa, como las de KLH), participan en la progresión y metástasis del tumor. Hay adenocarcinomas con proteínas en su membrana y aumento de los O-linked, que ayudan a la progresión del cáncer (mucinas (MUC1). Los O-linked de KLH2(en la FU-2c) tendrían propiedades antitumorales, por reacción cruzada con los carbohidratos de las proteínas tumorales. La inmunogenicidad de las hemocianinas se relacionaría con los LB de memoria, generados en una estimulación con xenoantígenos con epítomos peptídicos e hidrocarbonados de una reacción cruzada. El carcinoma de vejiga y el melanoma son modelos experimentales con el uso de KLH como carrier-adyuvante de tipo gangliósido o mucina que potencia a las CD pulsadas con extractos de melanoma. Riggs, (2000-2002), mostró que KLH posee un efecto antitumoral per se e in vitro, y analizó este efecto con CCH y FLH. (141-142-143-144).

##### **5): La respuesta inmune, los CLR y las nanopartículas de polianhidrido.**

Estas ofrecen ventajas para adaptar las **RIC** y **RIA**, ya que regulan a las CPA, y les dan antígenos para el procesamiento y la presentación. Se decora la membrana con nanopartículas de polianhidrido a carbohidratos para simular propiedades del patógeno, donde hay galactosa y di-manosa, con destino al CLR de MØ alveolares y de CPA. Se aumenta la expresión de CMH-I y II, CD86, CD40 y el CLR, así como, la de los **MR** de MØ y su lectina-galactosa, y de las IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT- $\alpha$ .

**6): Receptores “scavenger” (basurero) (SR).** Son glicoproteínas de la membrana que reconocen lipoproteínas (oxidadas [ox] o acetiladas [ac]) de baja densidad (LDL). Dado que las CA sufren estrés oxidativo, sus lipoproteínas oxidadas están en su membrana y se detectan por los SR. SR-A reconoce a ox-LDL, ac-LDL y al LPS por el MØ. Los ratones deficientes en SR-A disminuyen la fagocitosis de timocitos apoptóticos un 50%. Hay 2 vías para que SR-A reconozca CA. La primera es la unión de CD14 a las CA y la segunda es la interacción con el PSR. SR-B se une a la PS y es homólogo con el CD36. Hay variantes por

su dominio C-terminal que son SR-BI y SRBII. Se unen a lipoproteínas de alta densidad (HDL), y SR-BI es eficiente para el transporte del colesterol. Los estudios en células COS vieron que SR-B se une a la PS de timocitos murinos apoptóticos. El CD36 se une a lipoproteínas nativas, y a fosfolípidos aniónicos, como la PS, y media la fagocitosis de las CA. LOX-1 se une a células senescentes y apoptóticas, y reconoce ligandos y lipoproteínas modificadas. El LOX-1 reconoce a las CA por ligandos específicos y liposomas de PS, modulando las citoquinas, la activación del NF-κB y la apoptosis. Los SR median la **RIC** al reconocer **PAMPs**, como lipoproteínas bacterianas, ADN no humano, etc. Su función es la de "limpiador", pues remueve lo inservible ("basura"), por su gran especificidad.

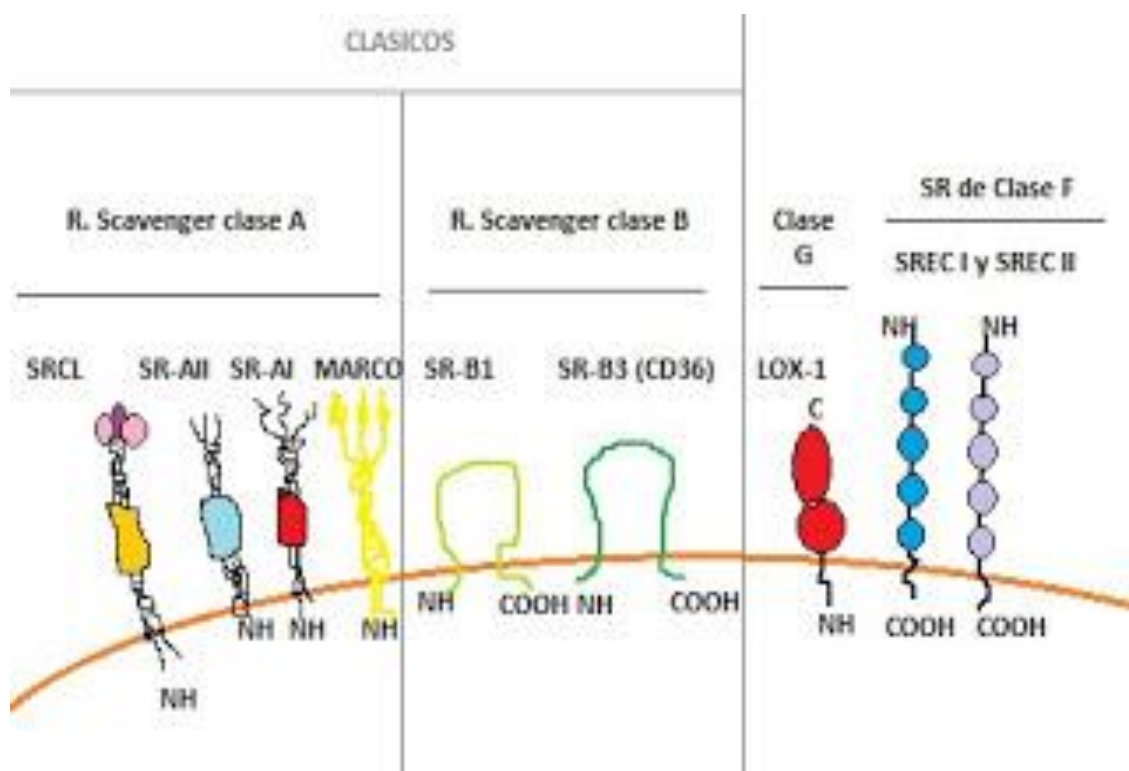
**Clases de SR:** se describen 3 tipos de SR (A, B y C), pero hay otros como los de clase E (LOX 1), los de clase F (SREC-I SREC-II), los de clase G (SR-PSOX) y los de Clase D (CD68).

**Receptores de tipo A:** son 2, el SR-A1 y el SRA2, con un dominio similar al colágeno que es esencial para la unión al ligando. Ejemplos: MSR1, MARCO, SCARA3, SCARA4 y SCARA5. Se expresan en MØ.

**Receptores de tipo B:** son los CD36 y SCARB1. Se hallan en invaginaciones de la membrana. SCARB1 interactúa con HDL y LDL; SCARB3 o CD36 se involucra en la adhesión celular, el metabolismo de los ácidos grasos y la fagocitosis de las células apoptóticas.

**Receptores de tipo C:** existe en la mosca *Drosophila*, con dominios similares a la mucina.

Fig 17-1: Describe los distintos tipos de receptores "scavenger".



**7): Receptores solubles. Lectina de unión a manosa (MBL): actividad biológica.** La MBL es una colectina (glucoproteína) sintetizada en el hígado y secretada a la sangre, que se une a azúcares de los patógenos, eliminándolos por el SC y serín-proteasas. Su deficiencia provoca infecciones en niños e inmunosuprimidos. Las terapias con MBL resultan prometedoras. Se halla en las secreciones nasofaríngeas, el fluido del oído medio,



los líquidos sinovial y amniótico, y es un reactante de fase aguda. Es de la familia de las lectinas tipo C,  $Ca^{++}$  dependiente, con dominios tipo colágeno. Es una cadena polipeptídica de 32 kDa con 4 regiones: una N- terminal de 20-21 aminoácidos ricos en cisteína, que oligomerizan con la formación de SH-SH; otra rica en colágeno con 18-20 unidades O-glicosiladas repetidas; otra tipo alfa-hélice, y la región C terminal, que es la de reconocimiento de carbohidratos  $Ca^{++}$  dependiente, que se unen a manosa, N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina y L-fucosa. Esta unidad con una triple hélice como la unidad monomérica, forma oligómeros para su estructura cuaternaria. La oligomerización aumenta la avidéz. La MBL sérica está codificada en el cromosoma 10. Las variantes genéticas (la A) son mutaciones aisladas sustituyen un aminoácido en los codones 52 (la D), 54 (la B) ó 57 (la C), y por dimorfismos alélicos en la región promotora (X/Y, H/L y P/Q). La proteína sintetizada y su capacidad para activar el SC dependerá del haplotipo heredado en forma autosómica dominante. En la activación del SC, actúa la MBL, con estructura semejante a la del C1q, que se une con las proteínas MASP1 y MASP2, semejantes al C1r y el C1s, para actuar sobre el C4 y el C2, igual que el C1, que forma la C3-convertasa. Los que portan una sola mutación tienen el 10 % de la actividad de la lectina normal, mientras que los homocigotas y heterocigotas con más de una mutación, poseen niveles muy bajos o no detectables. Hay áreas geográficas, con mutaciones en el gen de la MBL y bajos niveles de ella. Los alelos mutados son frecuentes donde las enfermedades por micobacterias son endémicas, y hay asociaciones entre los bajos niveles de MBL e infecciones bacterianas graves en neutropénicos o con meningitis bacteriana. En menores de 2 años, se valoró el riesgo de las infecciones respiratorias agudas, y se observó una prevalencia 2 veces mayor en los deficientes en MBL entre 6 y 17 meses, con la pérdida de los anticuerpos maternos. Los bajos niveles de MBL acompañan a las deficiencias de las subclases de IgG, de la quimiotaxis y de la neutropenia por quimioterapia. Las indicaciones terapéuticas serían niños con infecciones respiratorias, artritis reumatoidea o fibrosis quística, enfermos con neoplasias hematológicas, trasplantados e inmunosuprimidos. Es la MBL un eficaz miembro de la **RIC**. <sup>(145-146-147-148)</sup>.

### **8): Receptores de colectinas, pentraxinas y complemento.**

Las colectinas son proteínas que incluyen a la MBL, a las proteínas SP-A y SP-Dy al C1q. Oponizan y fagocitan patógenos, al igual que el C1q. Este se une en fase de apoptosis temprana y promueve su eliminación con citoquinas en las CD. Las colectinas y el C1q tienen una cola de colágeno que con el  $Ca^{++}$  se une a la calreticulina. Esta se une al CD91, y ambas, con las SP-A y SP-D reconocen a las CA. Las pentraxinas incluyen a la proteína C reactiva (PCR), al amiloide P del suero (APS) y a la pentraxina 3 (PTX3), que se unen a las CA en fase tardía y son fagocitadas. PCR y APS mejoran la fagocitosis de CA en ausencia del SC, unión que inhiben los fosfolípidos. La PCR y el APS inducen la fagocitosis, y, la PTX3 actúa como una opsonina inhibitoria. <sup>(149-150)</sup>.

### **9):Pentraxinas (PTX).**

Están implicadas en respuestas agudas. Son receptores de **PAMPs**. Son 5 subunidades (protómeros) idénticos, unidos en forma no covalente en un pentámero cíclico. En la PCR, cada protómero tiene 23 kDa. Las PTX se unen a sus ligandos por mecanismos dependientes del  $Ca^{++}$ . Cada protómero de PCR liga 2 átomos de Ca y se une a 1 molécula de fosfocolina, que activa a la PCR. La unión de ésta al polisacárido C del neumococo es por la fosfocolina, que está en las cabezas polares de la fosfatidilcolina y la esfingomiéline de las membranas humanas, cuyo daño expone a la fosfocolina al reconocer a la PCR. Así, las



células dañadas son el blanco de la **RIC**, con el SC y los MØ con RFc- $\gamma$ .

#### **La PCR es transportada al núcleo.**

La PCR reacciona con antígenos propios del núcleo celular. En la sinovial reumatoide se halló PCR en el núcleo de las células inflamatorias, por la unión con la proteína ribonuclear pequeña, o complejos del ARN rico en uridina y más de 10 proteínas. La PCR es transportada al núcleo por un proceso activo de un péptido corto, que se halla en la PCR y en el APS. El traslocar al núcleo y unirse a los antígenos nucleares del LES sugiere que las PTX ingresarían al núcleo para eliminar material nuclear.

#### **La PCR activa la vía clásica del SC.**

La unión a ligandos está en el pentámero de PCR, y así asegura la activación de la vía clásica del SC por el C1q. Sus efectos son iguales a las de la IgG, pues se observa el C3 sobre la membrana de la célula. La PCR se une al factor H, un regulador que inhibe la cascada posterior al C3, y promueve fagocitosis sin inflamación. La unión de la PCR a los PMN es por los RFc- $\gamma$ , y es una opsonina para las bacterias. La fagocitosis por PCR aumenta con el SC y hay un receptor involucrado, que sería el RFc $\gamma$ -IIa. En el hombre y en los animales, la PCR se une a los RFc $\gamma$ -I y RFc $\gamma$ -II, pero no al RFc $\gamma$ -III. La PCR es proinflamatoria, pues estimula a la IL-1 y al FNT- $\alpha$  de los monocitos humanos. La PCR actúa en las **RIC** y **RIA**. Inhibe la síntesis de autoanticuerpos bloqueando antígenos, evitando su unión con los RFc- $\gamma$ , y eliminando células apoptóticas. En la AR, la PCR es menor en el líquido sinovial que en el suero, y se deposita en la sinovial o es consumida en él. Hay PCR en los núcleos de las células sinoviales correlacionados con la activación del SC. Las elevaciones de la PCR se asocian con el daño miocárdico y las lesiones ateroscleróticas, pues se une a las LDL y activa su fagocitosis por los RFc- $\gamma$  de los MØ. (151-152-153-154-155).

**Estructura:** las PTX poseen una estructura similar a la de las lectinas de las leguminosas. Su nombre deriva del griego "cinco bayas" por la simetría radial de 5 monómeros formando un anillo de 95nm por 35nm. Las PTX "cortas" son el APS y la PCR y las largas las PTX neuronales.

**Proteína C reactiva (PCR):** es una PTX con un plegamiento único. Es una reactante de fase aguda que aumenta por la IL-6 sérica, desde los hepatocitos, adipocitos y MØ. Sus niveles séricos aumentan en 6 horas y alcanzan el cenit en 48 hs. Fue descubierta por Francis y Tillett en 1930, como una sustancia sérica de pacientes febriles que reaccionaba con el polisacárido C del neumococo. El gen de la PCR está en el cromosoma 1. La PCR tiene 25,106 kDa y 224 residuos. Es un disco pentamérico anular.

#### **10): Ficolinas: proteínas de reconocimiento de la RIC como sensores de peligro.**

Forman oligómeros similares al colágeno y dominios como el fibrinógeno. Detectan **PAMPs** o células apoptóticas. En el hombre, las ficolinas L y H son séricas, mientras que la M es secretada por los MØ. Como las MBL, junto a las serin-proteasas activan al SC. Son opsoninas incrementandola fagocitosis. La ficolina L une moléculas acetiladas y carbohidratos neutros por sitios diferentes, mientras que la H posee un sitio para los carbohidratos neutros. La filogenia reveló que son muy conservadas en la evolución, y que el SC primitivo era una opsonina de lectinas, para detectar carbohidratos en la **RIC**.

#### **Organización molecular de las ficolinas.**

El SDS-PAGE sin reducción detectó su alto peso molecular. Su cadena polipeptídica es una región N terminal con 2 residuos de cisteína, una región de tripletes Gly-X-Y, y un C-terminal como fibrinógeno (FBG) o dominio de 210 residuos con un segmento corto. Tres polipéptidos asociados a la estructura homotrimérica unen un colágeno de triple hélice y un dominio globular de 3 dominios FBG. No hay un cuello helicoidal entre el colágeno y el dominio de reconocimiento. Las cisteínas de la región N-terminal forman una cadena con el SH-SH unido por la oligomerización, y las ficolinas L y H son tetrámeros y hexámeros de unidades estructuradas. La ficolina M recombinante es oligomérica con una masa de 440 a 610 kDa. (156-157-158-159-160).

**Reconocimiento y ligando específico del patógeno.** La ficolina L es una lectina específica  $Ca^{++}$  dependiente para los residuos de N-acetil glucosamina (GlcNAc), de la GlcNAc-agarosa, neoglicoproteína GlcNAc-BSA, pero no para residuos de manosa. Por ello, se ligan a la cepa Ra (TV119) de *Salmonella typhimurium*, que posee muchos residuos GlcNAc.

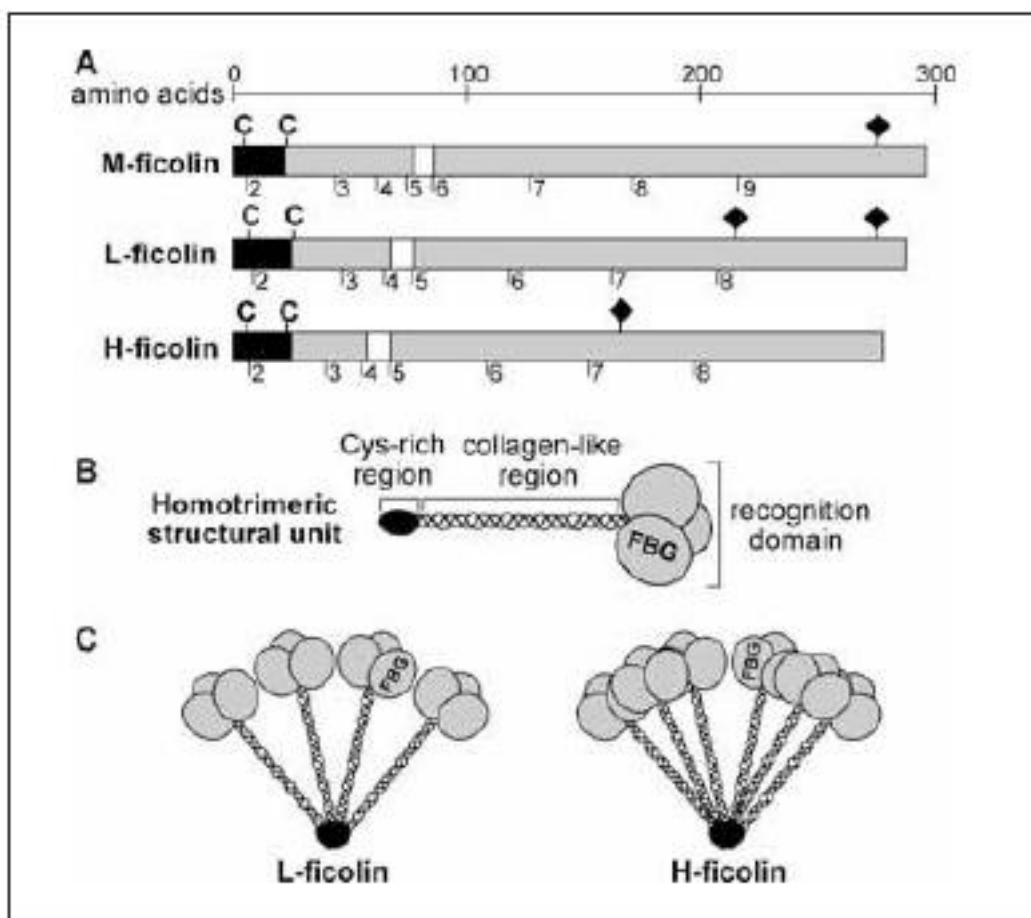


Fig. 18: Dominios y organización de las ficolinas humanas. (A): Cada polipéptido posee una cisteína rica N-terminal (en negro), una región de colágeno (entramado), un segmento de vinculación (en blanco) y una serie FBG (en gris). Los límites del exón, los oligosacáridos vinculados N (♦) y los 2 residuos de cisteína N-terminal. (B): Tres polipéptidos hacen una subunidad estructural. (C): Las subunidades ensambladas forman tetrámeros (ficolina L) o hexámeros (ficolina H).

TABLA III. Ficolinas humanas.

	Gene			Protein			
	Chromosomal locus	Tissue expression	Exons	Monomer (kDa)	Polypeptide chains	Collagen triplets	Location
M-ficolin (FCN1)	9q34	Monocytes, lung	9	35	12 or 18	19	Monocytes
L-ficolin (FCN2)	9q34	Liver	8	35	12	15	Serum
H-ficolin (FCN3)	1p35.3	Liver, lung	8	34	18	11	Serum, bronchus, bile

**Amiloide P del suero (APS):** son apolipoproteínas asociadas a las HDL del plasma. Sus isoformas son en respuesta a estímulos inflamatorios. Se producen en el hígado, y su papel es importante en la Biología. Transporta el colesterol al hígado para su secreción en la bilis, recluta células inmunes a sitios de la inflamación, y activa enzimas que degradan la matriz extracelular. APS está unido a las enfermedades crónicas, como la amiloidosis, la aterosclerosis, y la AR. Los ratones poseen 3 isoformas de APS, el APS1, el APS2, y el APS3. Los genes de los APS1 y APS2 en los hepatocitos están activados por las IL-1, IL-6, y FNT- $\alpha$ . Hay 3 para los APS humanos, pero el APS3, es un pseudogen sin ARNm. Como la PCR, aumenta después del estímulo, y su nivel es mayor que el de aquella. Además de los hepatocitos, lo sintetizan los adipocitos, y su nivel sérico sigue a la masa corporal.

**El APS constitutivo:** es un cuarto APS humano que se expresa en el hígado y, por ello, se definió como APS constitutivo. Equivale a una proteína del ratón llamada SAA4, que se llamó antes SAA5.

**Receptores solubles: surfactante pulmonar (SP).** Es una lipoproteína que tapiza a los alvéolos, para disminuir la tensión superficial (TS) de la interfase aire-líquido. Previene la atelectasia al final de la espiración, permitiendo una buena dilatación de la vía aérea periférica. Posee 2 vías de síntesis: la detrimetilación (inicial) y la más importante, la de la CDP colina, que se desarrolla en la semana 35 de gestación. La producen los neumonocitos tipo II a partir de la 16ª semana y se acumula como cuerpos lamelares. Por las catecolaminas, el AMPc, el ATP y el Ca<sup>++</sup>, pasa al nivel extracelular y superficie alveolar como mielina tubular. Tiene fosfolípidos (80 a-90%) y proteínas (10%). Los fosfolípidos son el Dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), el fosfatidilglicerol(PG), la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol, con lípidos neutros. Las proteínas, son útiles para la absorción y distribución del SP en los alvéolos; son tipos A, B, C, D, con distintas funciones. La SPA, de mayor peso molecular, es la mielina tubular, recicla al SP y es antiinfecciosa al activar a los MØ; la SPB, mejora la absorción de los cuerpos lamelares y distribuye a los fosfolípidos, y, la SPD, de los neumonocitos tipo II y del epitelio bronquial, como la SPA posee escasa capacidad para disminuir la TS. Las funciones del SP son: 1): disminuir la TS para conservar el volumen pulmonar al final de la espiración y evitar el colapso, y, 2): mantener al alvéolo sin líquido. Los efectos pulmonares por el SP son: 1: aumento de la PaO<sub>2</sub>; 2: disminución de la presión media de la vía aérea; 3: disminución de la FIO<sub>2</sub>; 4: homogeneización de la ventilación; 5: aumento de la presión de apertura; 6: aumento del volumen pulmonar; 7: estabilización del final de la espiración; 8: aumento de CRF (capacidad residual pulmonar), y, 9: aumento de la compliance (capacidad de distensibilidad). El aumento de la oxigenación es la respuesta objetivable, después de la administración del surfactante exógeno (SE). Es más precoz al usar SE natural que sintético, por la disminución de la presión media de la vía aérea, y, de los requerimientos de oxígeno FiO<sub>2</sub>. La

homogeneización de la ventilación es el efecto más importante del SE, y el aumento del volumen pulmonar lo que se ve a nivel radiológico. El pulmón con déficit de SP se resiste a la expansión por la gran TS. <sup>(161-162)</sup>.

### **El surfactante exógeno (SE).**

Fue un desafío científico cuando Von Neegard (1929) describió la TS. En la década de 1950, Clements sugirió que en los pulmones sanos había algo que disminuía la TS. En 1956, él mismo aisló esta sustancia que llamó SP, y, en 1959, Avery y Mead señalaron que los recién nacidos con déficit del SP, fallecían. El uso del SE ocurrió en 1960, con el DPPC aerosolizado en niños con déficit respiratorio, pero sin beneficio dada la incompleta formulación del SE. El modelo animal exitoso con el SE lo hizo Enhorning (1972), utilizando SP natural del lavado pulmonar de conejos maduros directamente introducido en la tráquea de conejos inmaduros. Se vio la mejoría de la compliance pulmonary de la expansión alveolar. En 1972, Clements acotó la importancia de las proteínas en el SP humano, y luego Adams y Fujiwara, publicaron el primer ensayo exitoso con SE en japoneses. Es el fármaco, para los recién nacidos, el mayor avance terapéutico desde la CPAP (Presión Positiva Continua en la vía Aérea). <sup>(163-164)</sup>.

### **Tipos de SE.**

Los SP naturales son homólogos o heterólogos, según su origen humano, bovino, bovino modificado, o porcino. El extracto natural modificado posee fosfolípidos, mientras que el no modificado, contiene los residuos que quedan de la extracción de proteínas que en los SE es del 1 % y sin SPA. Los SP sintéticos se usan en recién nacidos prematuros (antes de las 34 semanas). Hay varios tipos de SP: 1.-Extracto lipídico de pulmón bovino pulverizado enriquecido con lípidos sintéticos (Survanta); 2.-Extracto lipídico de lavado pulmonar bovino (Infasurf); 3.-Mezcla de lípidos sintéticos (Exosurf), que contiene sólo el DPPC (85 %), y, reemplaza a otros fosfolípidos y proteínas, agregando 2 componentes: el hexadecanol al 9% y el tiloxapol al 6%. Los bovinos contienen SPB y SPC, pero no SPA; el sintético no contiene proteínas. En nuestro medio los más usados son: el Exosurf, el Survanta, el Natsurf (Natural), el Baby Fact B (Natural Modificado), y, el Alveofact (Natural). El SE se administra por instilación endotraqueal, con una sonda o un adaptador, y una dosis de 75 a 100 mg por kilo de peso. Esta debe ser alta para compensar la destrucción de los MØ y la inhibición por las proteínas plasmáticas.

**Receptores del complemento.** Las fracciones del SC o sus productos se unen a receptores celulares que intervienen en la inflamación y opsonización. En la tabla IV se sintetizan sus características generales.

TABLA IV. Receptores del complemento.

Receptor/Superfamilia	Ligandos	Funciones
Regulador de activación de complemento	C3b,C3b i,C4b,C4bi	Opsonización
CR1/CD35	C1q, MBL, SPA	Depuración antígenos/complejos inmunes
cC1qR	C1q, MBL, SPA	Regulación de cascada el complemento.
cC1qRp	C1q	Unión de complejos inmunes a fagocitos
gC1qR	C3d,C3dg, iC3b,	Quimiotaxis
CR2/CD21	Virus de Epstein Barr	Fagocitosis
Regulador de activación de complemento	iC3b	Quimiotaxis
CR3/MAC-1 /CD11c/CD18	iC3b	Agregación plaquetaria
Integrina $\beta 2$	C5a;C5a-desarginada	Regulación de la actividad de células B
CR4/CD11b/ CD18	C3a	Activación y proliferación de células B
Integrina $\beta 2$		Células dendríticas foliculares
C5aR/CD88		Activación de vía alterna
Proteína C-acoplada a receptores		Adhesión, extravasación (monocitos, macrófagos y neutrófilos)
C3aR		Fagocitosis (macrófagos y neutrófilos)
Proteína C-acoplada a receptores		Síntesis de óxido nítrico
		Adhesión y extravasación (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas)
		Fagocitosis (macrófagos, neutrófilos)
		Agregación plaquetaria
		Quimioatracción
		Desgranulación
		Fagocitosis
		Expresión de CR3 (macrófagos, neutrófilos)
		Desgranulación de mastocitos
		Contracción de músculo liso
		Síntesis de óxido nítrico

**CR1/CD35:** es una glicoproteína de 210-290 kDa con especificidad para los C3b, C4b, y, baja afinidad para iC3b. Es similar al factor H, al C4bp, al factor desacelerador (DAF), a la proteína cofactor de membrana (MCP), al CR2 y al C1r, al receptor de IL-2, a la glicoproteína 1  $\beta 2$ , a la cadena de la haptoglobina, y al factor XIIIb, que controlan el sistema. Estas proteínas son una familia reguladora de la activación del SC(RAC). El dominio extracelular del CR1 tiene 30 o más unidades de 60 a 65 aminoácidos, de los cuales 10 a 15 están conservados en la familia, incluidas 4 cisteínas ligadoras que crean una triple asa. El CR1 tiene 6 repeticiones homólogas largas (RHL) con un 70 a 95% de homología entre cada RHL, por la duplicación genética. El CR1 se expresa en monocitos, MØ, PMN, LT, CD foliculares, podocitos glomerulares, células de Küpffer y eritrocitos; une el C3b con el C4b e iC3b; produce fagocitosis, libera lactoferrina de los PMN, libera la IL-1, sintetiza prostaglandinas, y, depura CIC.

**Receptores del C1q:** son 3 proteínas celulares con afinidad por el C1q: 1): la **cC1qR** es hidrofóbica (56 kDa) como la calreticulina, y se une a la cola del colágeno del C1q;

2): la **C1qRp** (126 kDa) y promueve la fagocitosis. El producto del gen es de 641 aminoácidos, un líder de 21 aminoácidos y una secuencia de carbohidratos de tipo C de 156 aminoácidos, con 5 dominios como el factor de crecimiento epidérmico, una transmembrana de 25 aminoácidos, y una cola de 47 aminoácidos en su COOH terminal, y, 3: **gC1qR** (33 kDa) es una proteína que reconoce las cabezas del C1q. El gen produce una proteína de 282 aminoácidos, un líder de 13 aminoácidos y un fragmento hidrofóbico de 60 residuos. <sup>(165-166-167).</sup>

**CR2 (CD21):** es transmembrana con 145 kDa, especificidad para los iC3b, C3dg, C3b y C3i y

es anclaje para el virus de Epstein-Barr. Es de la familia RAC y se expresa por 2 productos de empalme alternativo. Su parte extracelular posee 3 alelos en los humanos. Está en los LB, astrocitos, plaquetas y epitelio faríngeo. Forma complejos con CR1, CD19 y CD23 y tiene 16 repeticiones cortas de 60-70 aminoácidos seguidas de 128 residuos. El dominio transmembrana tiene 28 aminoácidos y la cola de 34 aminoácidos traduce señales.

**CR3 y CR4:** los del tipo 3 (CR3/MAC-1/CD11b/CD18) y del tipo 4 (CR4, p150/95, CD11c/CD18) son glicoproteínas que comparten la cadena  $\beta$  o CD18. Tienen especificidad por iC3b, son integrinas y proteínas de adhesión, o integrinas  $\beta 2$ , por la subunidad  $\beta$ . Esta es una glicoproteína de 95 kDa codificada en el cromosoma 21, región q22 con 678 aminoácidos, 57 residuos de cisteína, con 24 en 3 unidades repetidas, un transmembrana de 23 aminoácidos con cola de 43 residuos. La subunidad  $\alpha$  del CR3 es una glicoproteína de 155 kDa con 1092 aminoácidos extracelulares, 26 transmembrana y 19 en la cola citoplasmática. Posee 63% de homología con CR4, que es una glicoproteína de 150 kDa, con 1081 residuos extracelulares, 26 transmembrana y 29 en la cola citoplasmática. CR3 y CR4 se codifican en las bandas p11 y p13.1 del cromosoma 16 humano. Ambos están en PMN, monocitos y MØ, y los 2 unen iC3b en una interacción  $Mg^{++}$  dependiente. La unión al CR3 activa señales para el citoesqueleto. La diapédesis de PMN tiene una adhesión por el CR3 con la uroquinasa del plasminógeno o CD87. Esto depende de una lectina del CR3 ubicada en los residuos 943-1047. La adhesión es reversible si la enzima CD87 se une a los residuos 424-440 del CR3.

**C5aR o CD88:** es una glicoproteína de 42 kDa con afinidad por el C5 y los C5a y C5a desarginado. El C5a está acoplada a la proteína G tipo rodopsina, con un arreglo de 7 hélices transmembrana. Hay otros miembros que son los receptores de los C3a, fMLP, IL-8, factor activador de plaquetas, taquikinina y receptores adrenérgicos. El gen del C5aR está en el cromosoma 19, posición q13.3-13.4. Se expresa en las células mieloides, endoteliales, de Küpffer, astrocitos y células de la microglia. El C5aR tiene mayor tamaño en los eosinófilos (50-55 kDa), que en los PMN (42 kDa). En PMN y monocitos remodela el citoesqueleto, la expresión de selectinas L, P y E, del ICAM-1, de los CR1, CR3 y CR4, y la síntesis de radicales libres. La señales mediada por las GTP y fosfolipasa D. El C5aR señala en MØ la fagocitosis de antígenos con SC en ausencia de IgG unida al RFc, durante la RIC cuando sólo hay IgM.

**C3aR:** posee 7 segmentos transmembrana con 482 aminoácidos que tienen 37% de homología con el C5aR, difiere en 175 aminoácidos de la segunda asa extracelular, con tamaño variable; una forma es de 54 a 61 y la otra de 86 a 107 kDa. Se expresa en monocitos, MØ, PMN y rara vez en linfocitos, células del hepatoma y en LB de amígdala y células de leucemia. El C3aR tiene alta y baja afinidad por su ligando; la primera, es pobre, y la segunda es la más prevalente, y aumenta con el  $INF-\gamma$ . Su unión con el ligando produce liberación de  $Ca^{++}$  porque la proteína G21-31 está involucrada. (Tabla V).

Tabla V. Distribución celular de receptores del complemento.

Célula	C5aR	C3aR	CR1	CR2	CR3/4	cC1qR	C1qRp	gC1qR
Monocitos (macrófagos)	+	+	+	-	+	-	-	-
Neutrófilos	+	+	+	-	+	-	-	-
Eosinófilos	+	+	+	-	+	-	-	-
Basófilos (mastocitos)	+	+	+	-	+	-	-	-
Células NK	-	-	+	-	+	-	-	-
Células B	-	-	+	+	-	+	+	-
Células T	-	-	+	+	-	+	-	-
Eritrocitos	-	-	+	-	-	+	-	-
Plaquetas	-	-	-	-	+	+	+	-
Células dendríticas foliculares	-	-	+	+	+	+	+	+
Kupffer	+	-	+	-	+	-	-	+
Estrelladas	+	-	-	-	-	+	+	+
Microglia	+	-	-	-	+	-	-	-
Astroцитos	+	-	-	+	-	+	-	+
Endoteliales	+	-	-	-	-	-	-	-
Epiteliales	+	-	+	-	-	-	-	-
Fibroblastos gingivales	-	-	-	-	-	-	+	+

### Proteínas reguladoras.

Las células del huésped tienen protección contralas acciones proinflamatorias y destructivas del SC. Hay 30 glicoproteínas controladoras, 20 séricas y 10 en la membrana, que regulan la activación, la depuración de partículas o células recubiertas de SC.

**Reguladores de la fase flúida:** el SC autoamplifica su acción por proteínas como el inhibidor del C1(C1-INH), el factor H, la clusterina (apo-J) y la proteína S(vitronectina).

**El C1-INH :** es una glicoproteína de 478 aminoácidos, de 105 kDa, y, cadenas de carbohidratos. Es una de las proteínas más glicosiladas del plasma, sintetizada en el hígado, en los monocitos y en los fibroblastos dérmicos, en respuesta al INF- $\gamma$ , y a las IL-1 e IL-6. Su gen codifica en el cromosoma 11 y tiene 8 exones y 7 intrones. El C1-INH inhibe a las serin-proteasas de los C1r y C1s con la autoactivación del complejo C1qrs. Inhibe a la calicreína, al factor XII de la coagulación y a las serin-proteasas de la MBL (MASP-1 y MASP-2).

**C4bp:** la proteína de unión del C4 es un inhibidor de la C3-convertasa de la vía clásica (C4b2b). Está formado por 7 cadenas idénticas y una cadena  $\beta$  ligadas por puentes SH-SH y enlaces no covalentes, como un pulpo, con unidades de consenso repetidas (SCR). Cada cadena tiene 3 SCR y actúa como factor desacelerador y desplaza al C2b del C4b2b; es un cofactor del I. El C4bp inactiva a los C4b, C4c y C4d.

**Factor H:** en la vía alterna es análogo al C4bp; es un inhibidor de la fase flúida del C3bBb. Posee 20 SCR en tándem; su gen está en el cromosoma 1. El NH<sub>2</sub> terminal tiene un dominio de unión para el C3b, y una vez que se unen, el factor H compete con el B por la unión del C3b, y desplaza a Bb de la convertasa del C3bBb. Otra inhibición de la convertasa es la participación como cofactor del I en la proteólisis del C3b al iC3b. En la membrana, el factor H discrimina entre los activadores y no activadores unidos al C3b; entre los primeros están



los microbios y entre los segundos, las células humanas y estructuras polianiónicas, como el ácido siálico y los glicosaminoglicanos.

**Clusterina, proteína S/vitronectina:** es una proteína sérica de 2 cadenas, con 70-80 kDa, induce la agregación celular, se une a los complejos del SC y previene su inserción en la membrana. Así, se forman complejos solubles que no lisan. La proteína S se sintetiza como una glicoproteína de una cadena, que por proteólisis, produce la forma de 2 cadenas. En el suero hay una mezcla de 65 y de 75 kDa, sintetizadas en el hígado, en las plaquetas y los MØ. La proteína S une a los complejos C5b-7 y C5b-9 y previene su adhesión a las membranas.<sup>(168-169-170).</sup>

### **Reguladores de membrana.**

Existen 4 reguladores bien caracterizados:

- 1): el receptor del C3b (CR1, CD35);
- 2): la proteína cofactor de membrana (MCP, CD46) y el factor desacelerador (DAF, CD55) que inhiben las C3/C5 convertasas;
- 3): la protectina (CD59) que es un inhibidor del CAM, y,
- 4): el factor homólogo de restricción (HRF) o proteína de unión C8 (C8bp), que es otro inhibidor del CAM.

Protegen a las células contra el ataque de membrana autólogo. El MCP/CD46, es una glicoproteína de 51-a 68 kDa, de las células hematopoyéticas y endoteliales, excepto eritrocitos. Contiene 4 SCR con 3 sitios de glicosilación. Se expresan 4 isoformas por célula y por tejido. MCP une al C3b y es cofactor I en la proteólisis de los C3b y C4b. La unión para el C3b está en el 3° y 4° SCR cerca de la membrana; el extremo NH<sub>2</sub> tiene 70 aminoácidos ricos en serina-prolina-treonina (STP), altamente glicosilada que dirige a la proteína hacia afuera de la membrana y la protege contra la proteólisis.

**DAF/CD55:** tiene 70 kDa de la membrana de las células sanguíneas, endoteliales, epiteliales y placentarias. El extremo NH<sub>2</sub> de DAF contiene 4 SCR y una región STP. DAF se une y disocia las convertasas C4b2b y C3bBb. La expresión de DAF es baja y liga patógenos.

**CD59:** la protectina es una glicoproteína (18 a 25kDa) que inhibe la lisis causada por el SC, y, tiene varios nombres (p18, MACIF, HRF20, MIRL, protectina o CD59). Está en las células sanguíneas, epiteliales, espermatozoides, miocardiocitos y células malignas. El gen del CD59 está en la p13 del cromosoma 11, con 4 exones. El CD59 se une al complejo C5b-8 y limita al complejo de C9. El CD59 se une a los patógenos.

**Un puente entre la RIC y la RIA:** las lectinas son el medio por el cual el sistema inmune discrimina “lo propio y no propio”, un mecanismo conservado desde los invertebrados. Son las moléculas más primitivas del SC.<sup>(171-172).</sup>

### **Enfermedades por la deficiencia de las proteínas reguladoras del SC.**

**Angioedema hereditario (AEH):** causado por la falta del C1-INH, es autosómica dominante y comprende los tipos I y II. El primero, con bajos niveles séricos del C1-INH, es la más frecuente y se debe a cambios en el gen (deleciones, inserciones o mutaciones), que impiden la producción del ARNm. El tipo II se debe a mutaciones del gen, y aunque haya nivel normal o elevado del C1-INH, éste es funcionalmente defectuoso. Hay una forma adquirida de AEH en las enfermedades linfoproliferativas, si bien clínicamente son idénticas, se caracterizan por accesos de edema no doloroso, sin prurito en piel y mucosas de la cara y extremidades, pero las formas gastrointestinal y respiratoria pueden ser graves. El C1-INH previene la permeabilidad vascular, pues regula las proteasas del factor XIIa y de la

kaliceína plasmática. El mediador del AEH es la braquinina y/o el C2b. Hay un descenso del C1-INH en el suero, las fracciones C2 y C4 se consumen durante los ataques, y el C3 es normal. El C1q distingue la forma adquirida de la hereditaria. Se tratan con concentrados del C1-INH, con plasma fresco o con agentes antifibrinolíticos. Los andrógenos como el danazol o estanozolol pueden ser útiles.<sup>(173-174)</sup>

**Glomerulonefritis tipo II y factor H:** éste es un regulador de la matriz extracelular, que une integrinas e interactúa con las PCR, trombospondina, sialoproteína, osteopontina y heparina. Su deficiencia causa glomerulonefritis membrano proliferativa del tipo II, que se halló en los lechones noruegos carentes del factor H, que mueren por insuficiencia renal, y que su vida se prolonga si se administra plasma o purificados del factor H. En los humanos es rara y más leve. La deficiencia del factor H induce a la vía alterna a un consumo exagerado.

**Hemoglobinuria paroxística nocturna:** es una enfermedad rara por la deficiencia de los factores CD59 y DAF. Presenta hemólisis intravascular, hemoglobinuria y trombosis vascular. Los PMN y eritrocitos carecen de proteínas de anclaje GPI. La síntesis de GPI requiere de la transferencia de N-acetilglucosamina al aceptor de fosfatidilinositol (PIG). Poseen una mutación del gen PIG-A del cromosoma X (Xp22.1), lo que impide la síntesis de GPI; las DAF y CD59 son ancladas vía GPI, que aumenta la lisis de los eritrocitos por el SC.

**Complemento e infección:** en 1883, Eli Metchnikoff descubrió la fagocitosis y señaló que el hospedero tiene una defensa celular contra la invasión microbiana; el SC activa la fagocitosis por la quimiotaxis, adherencia, y opsonización por los C3b e iC3b. La lisis por el CAM destruye a las bacterias, y una deficiencia desde la activación, hasta el CAM, aumenta las infecciones piogénas. *Neisseria gonorrhoeae* causa uretritis, y la resistencia del hospedero no depende del SC. Esta bacteria escapa a la acción del SC, con la sialilación de un residuo lactosil-terminal, que une al factor H, y convierte al C3b a iC3b y disminuye la unión del C3 total. La unión del H es crítica en la resistencia de las cepas de *N. gonorrhoeae*; las resistentes, pero sin residuos de ácido siálico terminal, unen cantidades del C3b como evasión. El análisis genómico de *Neisseria meningitidis* señala que la resistencia al SC está en los genes de la síntesis de ácido polisialico de la cápsula y de los lipooligosacáridos (LOS).<sup>(175-176)</sup>

**Deficiencias de los componentes del CAM:** predispone a la infección por *Neisseria meningitidis*, con meningitis y meningococemia, un grave problema sanitario con un millón de infectados por año (por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*), y 200 000 muertes (OMS). Para destruir estas bacterias, el ensamble del CAM es el requisito para la formación del “canal lítico”; la deficiencia en una de las proteínas del CAM (C5-8) está relacionada con los brotes de meningitis.

### **La RIC en la patología humana.**

**Deficiencias de lectina de unión a manosa:** en 1976, Soothill y Harvey, describieron 11 niños con un defecto en la fagocitosis, transmitido en forma dominante, que se corregía in vitro al agregar plasma normal. La MBL humana es una proteína sérica que forma un complejo con serin-proteasas (MASP-1, MASP-2 y MASP-3). Los complejos de MBL-MASP2 activan el SC sin un anticuerpo ni el C1, por la unión de la lectina a los azúcares bacterianos. La serin-proteasa degrada a C4 y a C2, igual que la esterasa de C1, con puentes covalentes de C4b2b, o convertasa del C3, que lo degrada, con las opsoninas C3b/iC3b. Un solo gen codifica para MBL y está en el cromosoma 10. Tiene polimorfismos en la región 5' del promotor y en el exón 1, que marcan su concentración en el suero, y 3 mutaciones en los

codones 52, 54 y 57 del exón 1, con defectos en la activación del SC. Las ficolinas-L, M y H son séricas similar al colágeno y al fibrinógeno, y éste es activo por su N-acetilglucosamina. Así, detecta carbohidratos de los patógenos. La ficolina-L (p35) es una opsonina, y la ficolina-H con las serin-proteasas activan la vía de las lectinas.

**Deficiencia de las fracciones del SC:** C4 tiene 2 formas, C4A y C4B, el 1% de los deficientes de C4, son homocigotas deficientes para C4A y cerca del 3% son homocigotas deficientes para el alelo C4B, sin enfermedad. La carencia del C2 es por la deleción de 28 pares de bases. Los pacientes con un alelo nulo del C2 tienen un codón prematuro y ausencia del C2. La deficiencia del C3 es la más grave. Los que poseen una deficiencia del CAM (C5 a C9) padecen infecciones por bacterias capsuladas, ya que los pili interactúan con el CD46, en la activación del SC.

**El SC e inflamación:** el SC activado causa daño por el CAM y los C4b y C3b que activan leucocitos. El SC es dañino por las C5a y C3a, que atraen células inflamatorias, por la vía de las lectinas que expone a los fosfolípidos y a las proteínas mitocondriales que se unen al C1q o por MBL. El SC se activa por anticuerpos, CIC o por la PCR.

#### **Complejos inmunes circulantes (CIC) y el SC.**

La **RIA** exhibe anticuerpos que forman CIC con su antígeno. El SC se une a los CIC por los dominios de inmunoglobulinas para el C1q, o por opsonización de anticuerpos con el C3b. Los CIC eliminan antígenos, microorganismos, y células infectadas o transformadas, y regulan la magnitud, carácter y duración de la inflamación. Causan daño tisular (hipersensibilidad del tipo III), y se acumulan en los capilares (capilaritis o vasculitis) de todos los órganos. La formación y depuración de los CIC depende del C1 por: 1): interactuar con receptores celulares de las inmunoglobulinas; 2): activar el SC o para unirse a sus receptores; 3): depositarse en los tejidos; 4): la liberación de anticuerpos y de antígenos solubles, y, 5): tamaño, valencia e isotipo de la inmunoglobulina. La primera observación de que los CIC juegan un papel importante en las enfermedades la hicieron, en 1905, Von Pirquet y Schick, en inmunizados con anticuerpos antidiftéricos obtenidos en suero de caballo. Luego, Frank J. Dixon y Jacinto Vázquez, con experimentos en conejos con CIC, lograron glomerulonefritis y vasculitis generalizada, detectando que el SC disminuía si los CIC se depositaban en los tejidos. Identificaron 3 etapas en esta patología: a) exceso de antígeno e inicio de la producción de anticuerpos; b) disminución del nivel del SC, equivalencia de antígeno-anticuerpos con formación y depósito de CIC, y c) los complejos se depuran y hay exceso de anticuerpos específicos. <sup>(177-178)</sup>.

#### **Complejos inmunes e hipersensibilidad.**

La hipersensibilidad del tipo III se inicia con la formación de CIC que activan la vía clásica del SC y generan C3a y C5a, que son quimiotácticas y liberan aminas vasoactivas. Estas, aumentan la permeabilidad vascular, facilitan la salida de PMN, que son reclutados en los sitios de depósito de los CIC, con inflamación y daño tisular. El SC inhibe la formación de CIC bloqueando la interacción Fc-Fc, solubilizando los ya formados, e insertando componentes como los C4b, C3b y C3d, que rompen la unión antígeno-anticuerpo. Los CIC formados por IgG (IgG1 o IgG3) o IgM activan la vía clásica por unión al C1q; los de IgA activan únicamente la vía alterna. La unión antígeno-anticuerpo cambia la conformación de la inmunoglobulina en el dominio de unión a su RFc. El depósito de CIC activa a los PMN que producen mediadores inflamatorios y activan o inhiben la expresión de genes de citoquinas, quimoquinas, moléculas de adhesión, prostaglandinas, la ADCC y el reclutamiento celular. Los fragmentos del SC asociados a los CIC se unen a los CR1, CR2,

CR3 o CR4 de eritrocitos, PMN, células mesangiales y linfocitos. CR1 depura CIC y se une a los complejos con C3b, iC3b o C4b, cayendo el depósito en los tejidos y facilitando la inactivación. CR2 no participa en la depuración de complejos inmunes, CR3 y CR4 se encuentran solamente en PMN y MØ. Los CIC asociados a C3 en la célula endotelial liberan elastasa y catepsina G con daño por proteasas; a nivel renal dañan la membrana basal e inducen proteinuria. Los CIC opsonizados con C3b y C4b son blanco de células que expresan CR1 (CD35) en su membrana. El C1q unido al CIC activa la vía clásica y la unión a PMN donde son destruidos. La selectina P (CD62p), el Mac-1 (CD11b/CD18), el C1q y la PCR intervienen en el depósito de los CIC. La ausencia de la selectina P impide la acumulación de PMN en los sitios con CIC tisulares. Mac-1 o el CR3 después de la adherencia del PMN, reorganiza las fibras de actina del citoesqueleto y evita que el PMN se libere del sitio con CIC y regrese a la circulación. La inflamación es atenuada por Mac-1 o por deficiencia de C3. La sustancia P es un neuropéptido vasoactivo que aumenta la permeabilidad vascular y amplifica la inflamación por los CIC; su liberación es temprana, precede a la de C5a, en la lesión por CIC. La producción exagerada o depuración anormal de los CIC son causa de patología. Las reacciones locales por CIC son por la acción antígeno-anticuerpo, originando vasculitis localizada. Algunos alérgenos producen IgG, como es el caso del pulmón del granjero, causado por las esporas de *Micropolyspora faeni* y *Thermoactinomyces vulgaris*, llamada alveolitis alérgica extrínseca o neumonitis intersticial por inhalación de antígenos de los desechos aviares, aunque la lesión sea del tipo IV. La enfermedad del suero se sufre 5 a 10 días luego de la inoculación de un antisuero heterólogo, con fiebre, linfadenopatías, artralgias, leucopenia, proteinuria y urticaria aguda. Es por el depósito de CIC en la membrana basal vascular, espacios intersticiales sinoviales, paredes alveolares, unión dermoepidérmica, regiones subepiteliales y subendoteliales glomerulares, con daño tisular. Participan las aminas vasoactivas, las quimioquinas, las citoquinas y las anafilotoxinas. Los CIC se unen a los PMN y monocitos a través de receptores del SC y de RFc promoviendo la fagocitosis y la liberación celular de citoquinas, enzimas proteolíticas y radicales libres, que causan daño tisular por necrosis. El tratamiento de las enfermedades por CIC depende de la gravedad de los síntomas, e incluye AINE, antipalúdicos, prednisona y drogas inmunosupresoras, como ciclofosfamida y azatioprina. Hay terapias experimentales con un monoclonal anti-C5 que inhibe la activación de C5, y en el futuro sería posible usar monoclonales contra RFc o anti-Mac-1 para evitarla activación de los PMN.

### **Complejos inmunes y la autoinmunidad.**

En las enfermedades autoinmunes, los CIC contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad, como en el LES, la artritis reumatoide (AR), el síndrome de Goodpasture (SG), el síndrome de Sjögren (SS) y la poliarteritis nodosa (PN). En el LES, los autoanticuerpos de IgG e IgM contra componentes del núcleo, como el ADN, las ribonucleoproteínas, las histonas y otras como Ro, La, Sm, interactúan de manera iónica, y forman CIC. Se producen autoanticuerpos contra los fosfolípidos y las plaquetas, los eritrocitos, los PMN y los linfocitos. Los CIC se depositan en los vasos de la piel, articulaciones, riñones y pulmones; reclutan células fagocíticas, y en la circulación causan coagulación y trombosis. Lo más grave en el LES es la nefritis, por el depósito de CIC con carga catiónica en las membranas basales glomerulares; por su tamaño no son depurados, se activa la vía clásica y la producción de citoquinas y aminas vasoactivas, aumentando la permeabilidad vascular, la proteinuria y el daño glomerular.

La mayor parte de los CIC en el LES son de IgG e IgM, y una vez formados se unen al CR1 de los eritrocitos y van al hígado para su eliminación. Hay pacientes con deficiencias de los C2, C4 y C1q y el 90% desarrolla LES. El SG se caracteriza por anticuerpos antimembranas glomerular, cuyos epítomos son el dominio NC1 de la cadena  $\alpha$  3 del colágeno tipo IV, de los alvéolos pulmonares y capilares glomerulares. Su inicio se debería a una infección respiratoria aguda o a la exposición a hidrocarburos. Se manifiesta por glomerulonefritis de rápida progresión y hemorragia pulmonar. La hipersensibilidad del tipo III puede ser inducida por fármacos, como las sulfonamidas, el tiouracilo, la hidantoína y los diuréticos tiazídicos. La anemia hemolítica y la plaquetopenia son ejemplos. Los CIC son importantes en infecciones como la endocarditis bacteriana subaguda, la glomerulonefritis postestreptocócica, el eritema nodoso leproso, el dengue, las hepatitis virales, y en parasitosis como el paludismo y la toxoplasmosis.<sup>(179-180)</sup>

#### **Identificación de los complejos inmunes en el suero de los pacientes.**

Las pruebas que se utilizan para estudiar los CIC son la precipitación y radiomarcado de C1q. Las pruebas de conglutinina detectan los CIC con iC3b. Son importantes las concentraciones de los C3, C4 y CH50. Se usaron células Raji y LB linfoblastoides, por sus RFc de baja afinidad para IgG, y, alta afinidad para receptores del SC.

**Complemento y necrosis.** La activación del SC aumenta la necrosis secundaria a la isquemia, lo que sucede en los infartos miocárdico y cerebral.

#### **Complemento y apoptosis.**

La muerte celular programada es continua, y se deben depurar 1,209/kg de material apoptótico por fagocitosis. El reconocimiento depende de moléculas como CD14, calreticulina, CD91, SRA, CD68, CD36, PtdSerR,  $\beta$ 2GP1R,  $\alpha$ 2 $\beta$ 3, vitronectina R y CD31. Además la CA expresa ICAM3, TSP1, oxLDL, y ACAMP. Otras moléculas son necesarias para la interacción entre los PMN y las CA. Se destacan iC3b, C1q,  $\beta$ 2GP1, Gas6, MFGE8, PCR y PTX. Las fallas del SC impiden el recubrimiento del material, que no es reconocido ni depurado, lo que produce una acumulación tóxica.

#### **Desechos celulares y autoinmunidad.**

La activación del SC empeora las lesiones inflamatorias en las autoinmunes, como el LES. Sus deficiencias congénitas aumentan el riesgo para desarrollar LES. Pero, en el LES la limpieza de la "basura" celular está alterada. Hay pruebas de que el SC participa en la limpieza del material apoptótico o necrótico. La falta del SC, sea transitoria por consumo (CIC), o real por deficiencias congénitas, favorecen el acúmulo de "basura", la que en individuos predispuestos gatillarían la síntesis de autoanticuerpos y la auto-inmunidad.

#### **Receptores Fc. (RFc).**

Pertenecen a la superfamilia de las Ig, y están en NK, PMN, MØ y mastocitos. Son específicos para la región Fc del anticuerpo. Su actividad estimula a células fagocíticas o citotóxicas para destruir microbios, directamente o por medio de la ADCC. Así, los anticuerpos tienen 2 funciones: la unión al antígeno, por su parte Fab y la activación de células, por su parte Fc-COOH-terminal; son un puente que une a la **RIA** con los mecanismos destructivos de los PMN y LTCD8+.

#### **Diferentes tipos de RFc.**

Depende del anticuerpo que reconocen. Así, hay RFc $\gamma$ , para la IgG, RFc $\alpha$  para la IgA, RFc $\epsilon$  para la IgE, RFc $\mu$  para la IgM y RFc $\delta$  para la IgD.

**RFc $\gamma$ :** posee 3 variedades, el RFc $\gamma$ I (CD64), RFc $\gamma$ II (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). Difieren en su avidéz por la IgG, por diferente estructura molecular. RFc $\gamma$ I tiene 3 regiones en su parte

extracelular y una IgG monomérica; RFc $\gamma$ II y RFc $\gamma$ III tienen sólo 2 regiones extracelulares y poseen avidéz por CIC. RFc $\gamma$ I se expresa en monocitos, M $\emptyset$  y PMN estimulados con INF- $\gamma$ . RFc $\gamma$ I presenta una cadena  $\alpha$ , que une a la IgG, asociada a un dímero de cadenas  $\gamma$ , con residuos ITAM que se fosforilan al activarse el receptor. Hay isoformas del RFc $\gamma$ II de 3 genes distintos y de procesamiento alternativo del ARNm. El RFc $\gamma$ IIA se halla en PMN, monocitos y M $\emptyset$ , mientras que el RFc $\gamma$ IIB se da en PMN, linfocitos, células cebadas y CD, por las IL-4, IL-10, y el TGF- $\beta$ . El RFc $\gamma$ II no tiene cadenas  $\gamma$  asociadas. La cadena  $\alpha$  del RFc $\gamma$ IIA tiene un ITAM en su porción citoplásmica, mientras que la cadena  $\alpha$  del RFc $\gamma$ IIB tiene, en su parte citoplásmica, una secuencia diferente con tirosina, con señales negativas o ITIM. El RFc $\gamma$ III tiene 2 isoformas: RFc $\gamma$ IIIA y RFc $\gamma$ IIIB. El RFc $\gamma$ IIIA une IgG y un homodímero de cadenas  $\gamma$  que tienen cada una un ITAM. El RFc $\gamma$ IIIA se expresa en M $\emptyset$ , en NKC y en CD. La cadena  $\alpha$  del RFc $\gamma$ IIIA aparece en basófilos y en mastocitos con un heterodímero de cadenas  $\gamma/\zeta$  y una cadena  $\beta$  extra. El RFc $\gamma$ IIIB se expresa sólo en PMN, sin porción citoplásmica unido a la membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los RFc $\gamma$  murinos son muy parecidos a los humanos, pero no idénticos. Hay que destacar los RFc $\gamma$ IIA y RFc $\gamma$ IIIB humanos, no se hallan en otras especies.

**RFc** está en los eosinófilos, monocitos, M $\emptyset$ , PMN y CD. Posee 2 dominios extracelulares y con cadenas  $\gamma$  envía la señal de activación intracelular. Se bautiza CD89. Se une a las IgA e IgM, por lo que se llama RFc $\alpha/\mu$ . Este, es una proteína transmembrana tipo I con una región tipo Ig extracelular y una débilmente a la IgA, pero se une con afinidad a la IgM. El RFc $\alpha$ I o CD89 tiene afinidad por la IgA y 2 regiones tipo Ig extracelulares, y un dímero de cadenas  $\gamma$ . Está en los PMN, eosinófilos, monocitos, M $\emptyset$  y CD. Activa el estallido respiratorio, la desgranulación y la fagocitosis por PMN, monocitos y M $\emptyset$ . En las CD, activa la presentación de antígenos. Facilita la endocitosis y el reciclado de la IgA.

La IgE es típica de las reacciones alérgicas, como anafilaxia, rinitis, asma y dermatitis atópicas. Hay 2 tipos de RFc $\epsilon$ : el de baja afinidad RFc $\epsilon$ II (CD23) y el de alta afinidad RFc $\epsilon$ I. El primero es una lectina tipo C con funciones como receptor soluble o receptor unido a la membrana; el segundo, es tetramérico, y se expresa en los mastocitos y los basófilos. El RFc $\epsilon$ I, de alta afinidad posee una cadena  $\alpha$ , que une IgE, y por cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  asociadas a la  $\alpha$ . Existen 2 formas en los mastocitos y basófilos:  $\alpha\gamma$ 2 y  $\alpha\beta\gamma$ 2. El papel de la cadena  $\beta$  es aumentar la expresión del receptor al promover la maduración y tránsito intracelular de la cadena  $\alpha$ . Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  contienen ITAM, que inician la señal. El RFc $\epsilon$ I se expresa en las CPA y regula la síntesis de las IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, el GM-CSF, el INF- $\alpha/\beta$ , el MCP-1, el TGF- $\beta$ , el FNT- $\alpha$  y el RANTES.

Receptor	Principal Anticuerpo que reconoce	Afinidad por el anticuerpo	Distribución celular	Funciones
Fc $\gamma$ RI (CD64)	IgG1 e IgG3	Alta (Kd ~ 10-9 M)	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Fagocitosis Estallido Respiratorio Inducción de muerte microbiana
Fc $\gamma$ RIIA (CD32)	IgG1	Baja (Kd > 10-7 M)	Macrófagos Neutrófilos Células cebadas Eosinófilos Plaquetas Células dendríticas	Fagocitosis Degranulación (eosinófilos)
Fc $\gamma$ RIIB (CD32)	IgG1	Baja (Kd > 10-7 M)	Macrófagos Neutrófilos Células cebadas Eosinófilos Células dendríticas Células B	No fagocitosis Inhibición de actividad celular
Fc $\gamma$ RIIIA (CD16A)	IgG1 e IgG3	Baja (Kd > 10-6 M)	Macrófagos Células cebadas Basófilos Células NK Células dendríticas	Inducción de Citotoxicidad mediada por anticuerpos
Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B)	IgG e IgG3	Baja (Kd > 10-6 M)	Neutrófilos	Inducción de muerte microbiana Activación de genes
Fc $\epsilon$ RI	IgE	Alta (Kd ~ 10-10 M)	Células cebadas Eosinófilos Basófilos Células de Langerhans	Degranulación
Fc $\epsilon$ RII (CD23)	IgE	Baja (Kd > 10-7 M)	Células B Eosinófilos Células de Langerhans	Posible molécula de adhesión
Fc $\alpha$ RI (CD89)	IgA	Baja (Kd > 10-6 M)	Macrófagos Neutrófilos eosinófilos Células de Kupffer	Fagocitosis Inducción de muerte microbiana
Fc $\alpha$ / $\mu$ R	IgA e IgM	Alta para IgM, Media para IgA	Células B Macrófagos	Inducción de muerte microbiana

### **RFc en las células fagocíticas.**

Cuando la IgG para un antígeno lo reconoce por su Fab, el Fc queda libre en la dirección opuesta y los fagocitos se unen a él por su RFc. La baja afinidad entre el anticuerpo y los RFc, unen al patógeno cubierto de anticuerpo al fagocito, lo que previene que los RFc unan a los anticuerpos en ausencia de antígeno, y evita que las células se activen cuando no hay una infección. Ante un patógeno, los Fc de los anticuerpos más los RFc $\gamma$  de los fagocitos inician la fagocitosis; el patógeno es internalizado y los mecanismos microbicidas se activan.



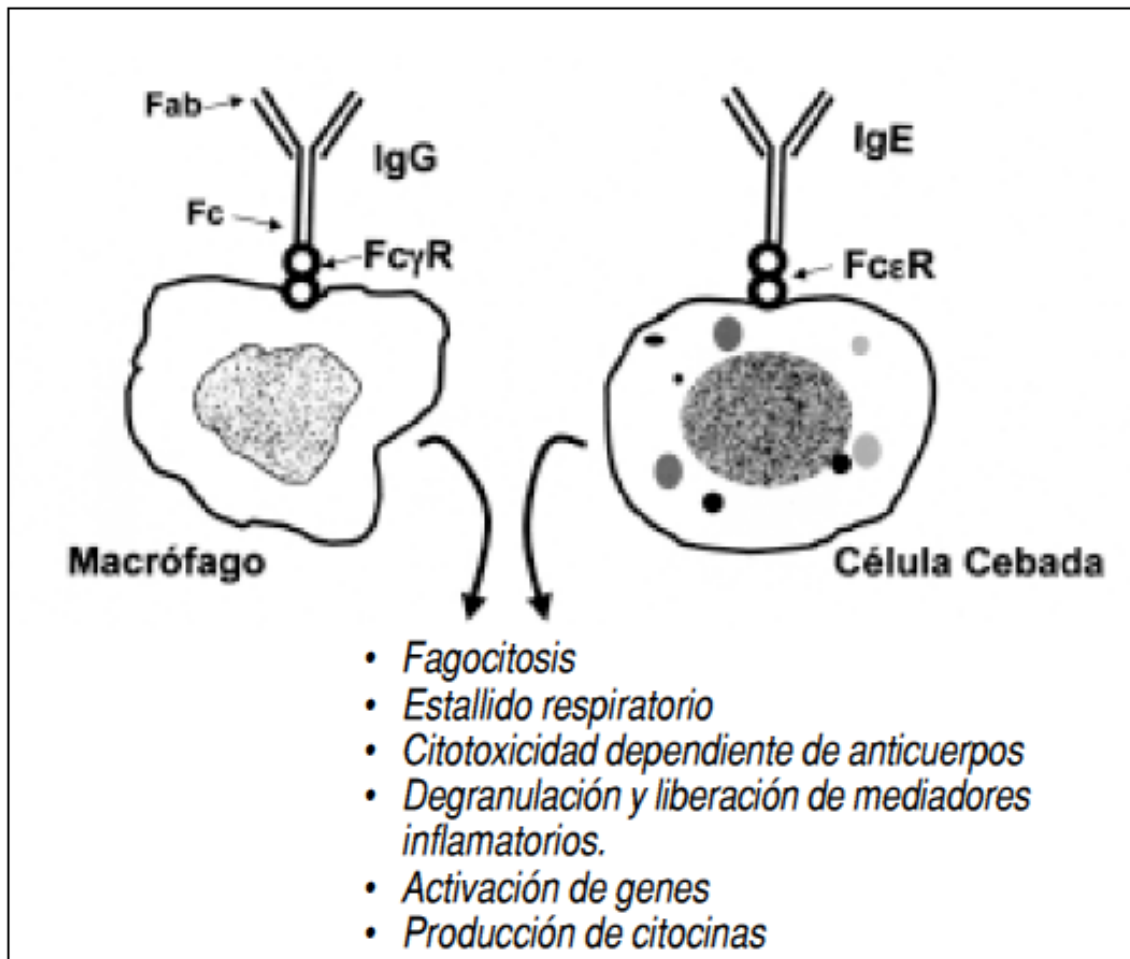


Fig.19: Funciones de los receptores Fc. La IgG está formada por 4 cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuros: 2 son pesadas y 2 livianas. En el NH<sub>2</sub> terminal, una cadena pesada y una liviana forman el Fab. La parte COOH terminal de las 2 pesadas, el Fc. La IgG se une a los RFc $\gamma$  en MØ y la IgE se une a los RFc $\epsilon$  en mastocitos.

### **RFc en las NKC.**

El RFc $\gamma$ IIIa en las NKC reconoce a la IgG unida a la membrana de una célula blanco infectada. (Fig.20 A).

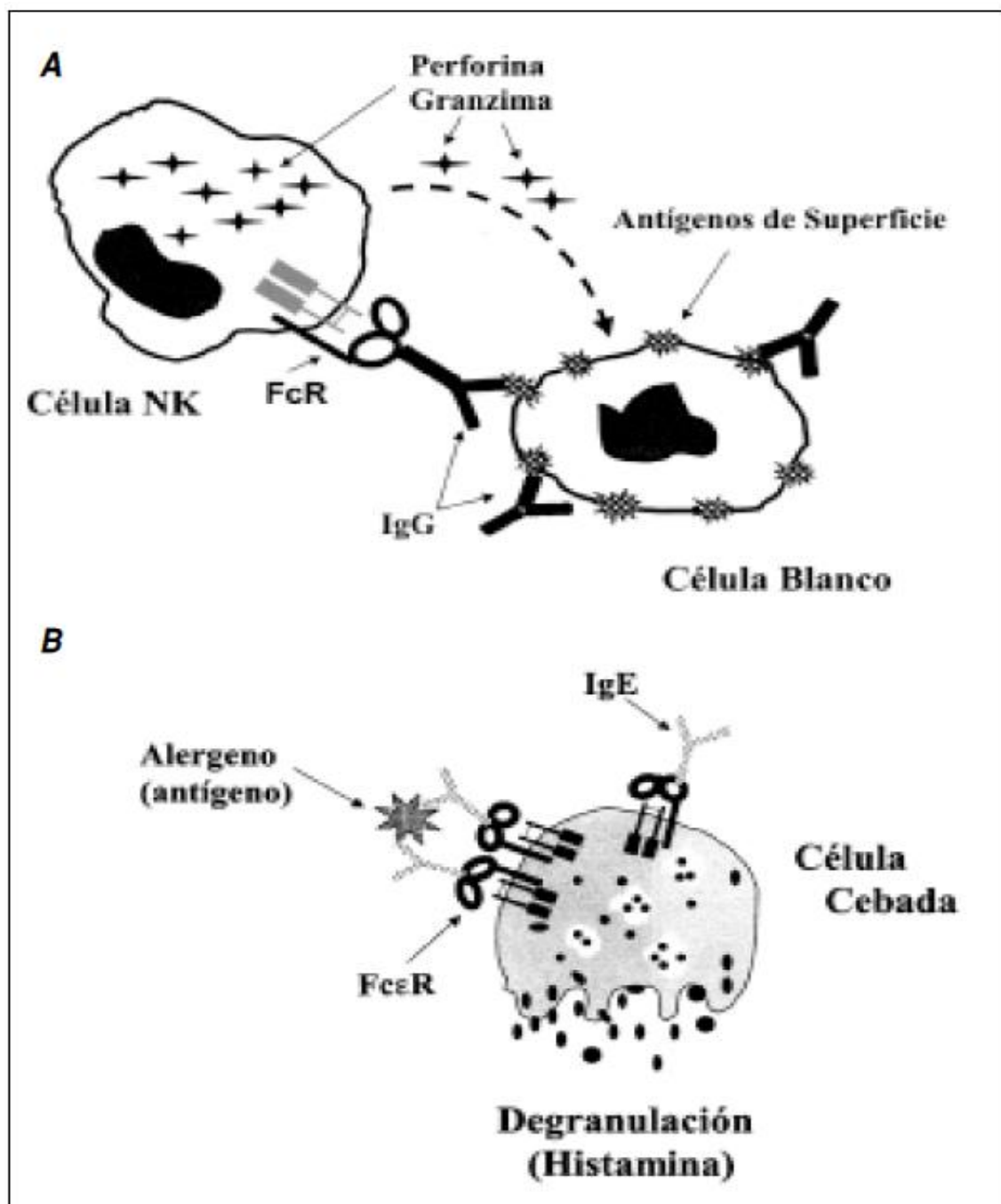


Fig. 20: Respuestas de RFc. (A): ADCC: el RFc en NKC más la IgG unida a antígenos de un patógeno o de célula blanco libera perforina y granzima, que provocan su apoptosis. (B): Hipersensibilidad: la IgE unida a los RFce en el mastocito. Con el alérgeno, las IgE se agregan induciendo la desgranulación, y liberación de histamina, enzimas, citoquinas y leucotrienos.

La activación del RFcγIIIa por la IgG causa la liberación de las perforina y granzima, que provocan la apoptosis. Este proceso o ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpos) es una estrategia para destruir células, y se usa para tratar algunos tipos de cáncer con un anticuerpo copulado con un agente citotóxico (“la antigua bala mágica”) para la célula tumoral o bien exaltando la ADCC. Los anticuerpos anti-tumorales inhiben la proliferación celular, la angiogénesis y las metástasis, al bloquear moléculas de tumorales. Hay

monoclonales como el Rituximab (anti-CD20), el Alemtuzumab(anti-CD52), el Cetuximab (anti-receptor de crecimientoepidermal [EGFR]), el ABX-EGF (anti-EGFR) y el Bevacizumab (anti-factor de crecimiento de endotelio vascular), en ensayos clínicos avanzados.

### **RFc en los mastocitos.**

Estos se hallan cerca de los capilares, los nervios y los epitelios, y abundan en los tractos gastrointestinal y respiratorio. Poseen gránulos con mediadores como la histamina, las proteasas y citoquinas, que son liberados por un proceso de desgranulación, e inducen las reacciones de hipersensibilidad del tipo I (alergias). Los alérgenos son sustancias que se reconocen por la IgE. En los alérgicos (individuos atópicos), la IgE sérica está elevada. La IgE, se une a los RFcεI de los mastocitos, y al llegar el antígeno, los RFcεI se agregan, activan a la célula y ésta se desgranula. Los mediadores causan síntomas como la vasodilatación y la broncoconstricción. El ácido araquidónico de la membrana mastocitaria da origen a las prostaglandinas y a losleucotrienos, con 1000 veces más actividad que la histamina a volúmenes iguales. Hay quimiotaxis para PMN, eosinófilos y monocitos, generando inflamación aguda y crónica de las mucosas afectadas. (Fig.20 B).

### **RFc en los eosinófilos.**

Parásitos como la Taenia solium o el Schistosoma mansoni son grandes para ser fagocitados por los leucocitos, y por su tegumento que resiste a las sustancias liberadas por los MØ y mastocitos. Al ser recubiertos por la IgE, son reconocidos por los RFcεI de los eosinófilos, que liberan la proteína básica mayor, y la peroxidasa, que los helmintos no resisten. Es una ADCC-IgE dependiente.

### **Mecanismos de traducción de señales de los RFc.**

Los RFcy se dividen en 2 clases: los activadores(RFcγI, RFcγIIA, RFcγIIIA, RFcγIV) y los inhibidores (RFcγIIB). Los activadores poseen ITAM, mientras que el inhibidor tiene ITIM. Las ITAM se encuentran en el RcT, el RcB, el RFcαI y el RFcεI. Las ITIM están en otros receptores inhibidores.

### **Señales de activación.**

La activación de los RFcy exalta a quinasas-Src con activación de quinasas-Syk. Las quinasas-Src están en la parte citoplasmática del receptor, porque los lípidos las mantienen en la membrana; pero son inactivas hasta que los RFcy se agregan. Como se activan estas quinasas no se conoce, pero tiene que ver con las balsas de lípidos, que son regiones de la membrana ricas en colesterol y esfingolípidos, de baja densidad, resistentes a detergentes no-iónicos como el Tritón X-100. Para el RFcγIIA, se vió que su agregación lo colocaliza en las balsas de lípidos, que facilita el señalamiento. Estando el RFcy en las balsas interactúa con las quinasas-Src, que, fosforilan a las ITAM del receptor. Los PMN, tienen quinasas-Src, Fyn, Fgr, Hck y Lyn, pero las involucradas en el señalamiento son Hck, Fgr y Lyn. Los ITAM fosforilados son sitios de unión para los SH2 de la quinasa-Syk, cuya actividad es estimulada. La quinasa-Syk, fosforila sustratos de las vías de señalamiento celulares o de la transcripción de genes. Luego se forma un complejo molecular de señalamiento con las moléculas adaptadoras SLP76 y LAT. (Fig. 21).En los PMN, la SLP76 es importante para la señalización del RFcy, pero los MØ y las NKC señalizan por su RFcy sin la SLP76. Así, los MØ deficientes de SLP76 tienen RFcy normal porque su adaptadora es la SLP65, de la familia SLP76. Los MØ carentes de ambas moléculas poseen RFcy normal, dado que ninguna de ellas es requerida para el RFcy en MØ, donde la molécula LAT ensambla el complejo de señalamiento luego de agregarse los

RFc $\gamma$ . La molécula homóloga NTAL, sustituye a la SLP76 y a la SLP65 en las señales del RFc $\gamma$ . Otras moléculas se asocian al RFc $\gamma$ ; así la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), el inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ), el diacilglicerol (DAG), la quinasa-C (PKC), la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3-K), a la ERK o MAP-quinasa (MAPK), a las GTP-asas de la familia Rho y a factores nucleares como el NF- $\kappa$ B. (Fig. 21).

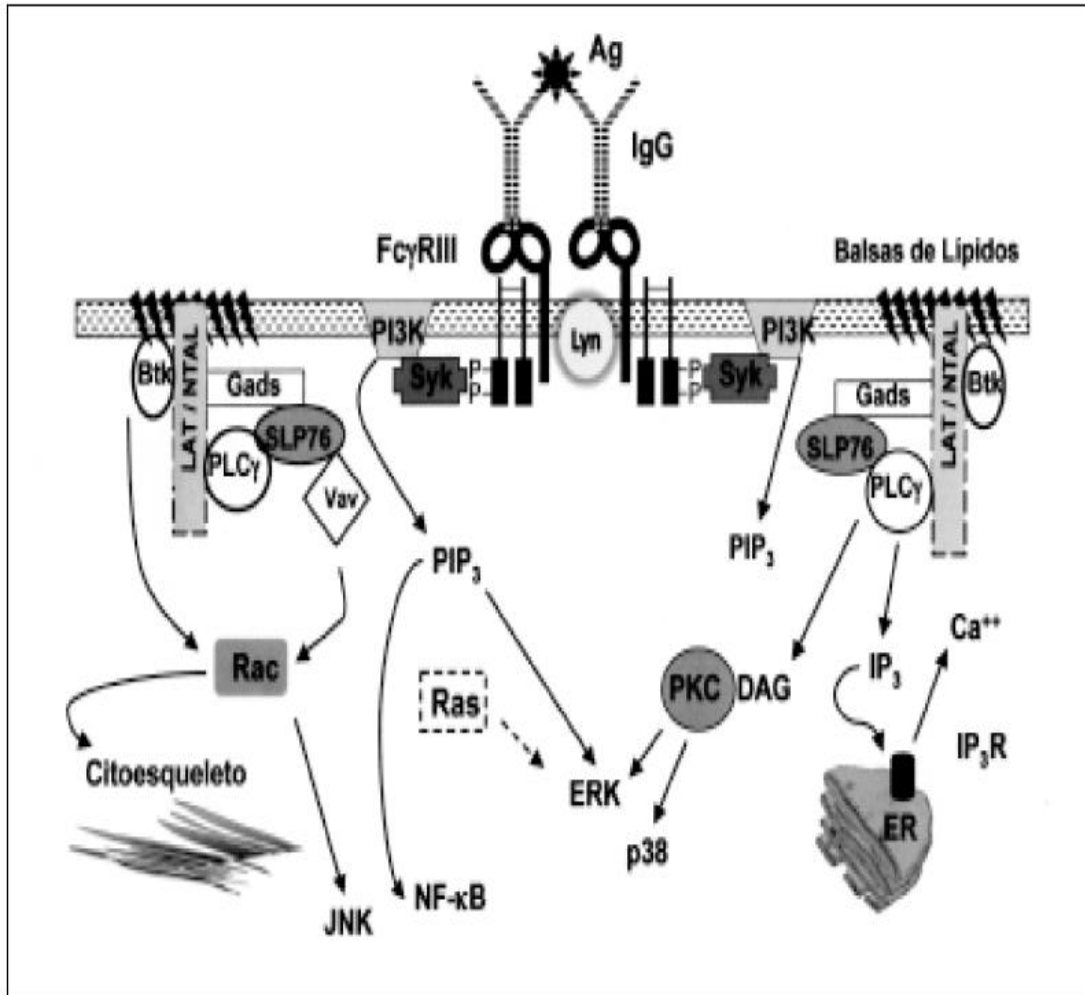


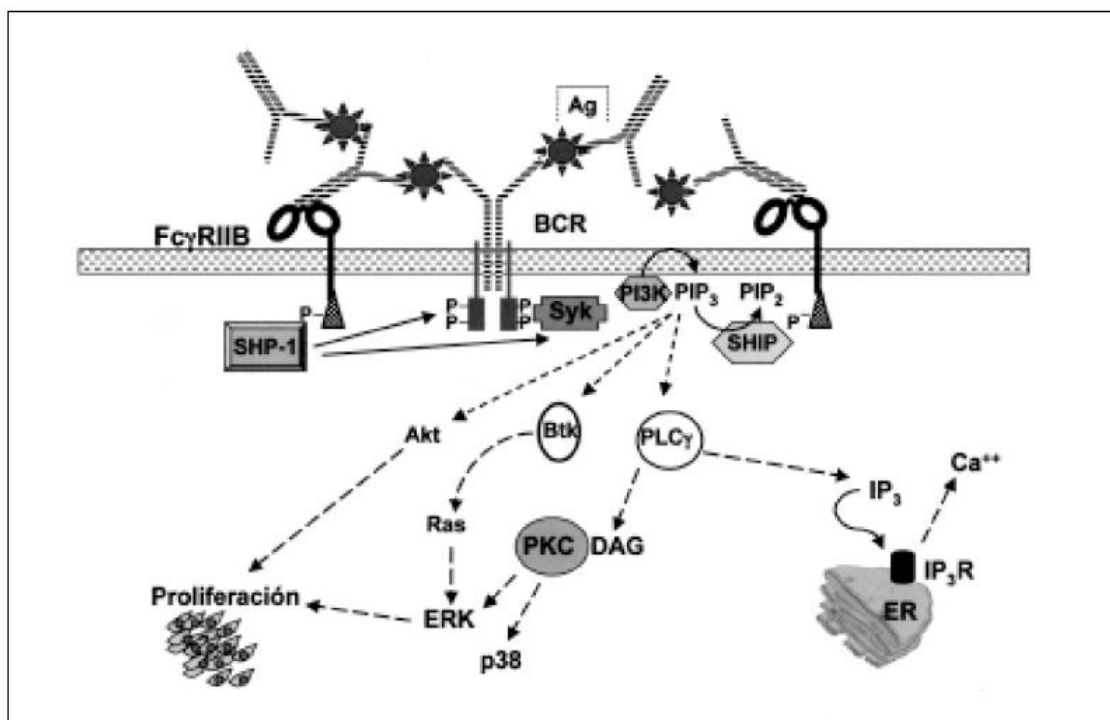
Fig 21: Señales de los RFc $\gamma$ . Se ve su agregación, la activación de las quinasas Src y Syk, las ITAM fosforiladas, el complejo de SLP76 y LAT, la fosfolipasa-1, el inositoltrifosfato (IP $_3$ ) y el diacilglicerol (DAG), que liberan Ca $^{++}$ , activan la proteína quinasa C, las quinasas ERK, p38 y Vav, el intercambiador de nucleótidos de guanina, las GTPasas-rho Rac, que regulan el citoesqueleto de actina. Las quinasas Btk y PI 3-K activan a la GTPasa-Rac y al NF- $\kappa$ B.

### Señales de inhibición.

Las señales de activación se negativizan por el RFc $\gamma$ IIB, que es el RFc de los LB. Cuando el RcB es co-agregado, por CIC junto con el RFc $\gamma$ IIB las respuestas de los LB son atenuadas. La inhibición es por el ITIM, que tiene 13 aminoácidos en su región citoplasmática, que fosforilan al ITIM por quinasas-Src y son sitios de unión para la fosfatasa de tirosinas SHP-1. (Fig.22). Además de ésta, la fosfatasa 1 de inositol 5 tiene una región SH2 que señala negativamente el RFc $\gamma$ IIB. Así, se impide que el complejo de señalamiento se ensamble, y

se inhiba la célula por 2 mecanismos. SHIP-1 impide la fosforilación y activación de los ITAM, por la quinasa Syk, y la PLC $\gamma$ . Degrada el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP $_3$ ), y es formado por la quinasa del fosfatidilinositol 3 (PI3-K). Con escasos lipidos, SHIP-1 inhibe el señalamiento de las Btk, PLC $\gamma$ , Akty ERK. Las inhibiciones del RFc $\gamma$ IIB son usadas por patógenos. El glucuronoxilomannan de los microorganismos se une al RFc $\gamma$ IIB, y recluta entonces a SHIP-1, que bloquea la activación del NF- $\kappa$ B e inhibe la respuesta inmune. La expresión del RFc $\gamma$ IIB está regulada por las IL-4, IL-10 y el TGF- $\beta$ , que aumentan su expresión, mientras que el C5a y el INF- $\gamma$ , la disminuyen y aumentan los activadores.

Fig. 22: Inhibición por el RFc $\gamma$ IIB. La coagregación con el antígeno en el R $\alpha$ B en su membrana fosforila ITIM por quinasas-Src. Aquí se unen las fosfatasas de tirosinas y la del inositol-5 (SHIP-1), que degrada al PIP $_3$ , generado por la quinasa PI 3K. (Las vías inhibidas están punteadas.)



### Receptores para los péptidos formilados. (RPF).

Están asociados a la proteína G relacionados con la quimiotaxis de los PMN, e identificados por unirse a péptidos N-formilados, como la N-formilmetionina de la degradación bacteriana y por las células infectadas. Los RPF poseen 7 dominios transmembrana (hidrofóbicos), que actúan entre sí y con moléculas adyacentes, generando unión con su ligando. Se asemejan a los receptores de las C5a y C3a.

### Estructura y función.

La conformación del RPF se estabiliza por el puente entre Arg84-Arg205, Arg205-Lys85, y Lys85-Asp284, que determina la tridimensionalidad de la transmembrana, y de residuos positivos, que actúan con los fosfatos de carga negativa. La Arg-163 se une al bolsillo del ligando del 2º bucle extracelular del

RPF. La unión del Met-Leu-Phe-formilo, con enlaces de H<sup>+</sup> entre Arg84 y Lys85 del 1° bucle extracelular, el grupo N-formilo del ligando y el formil-Met del ligando forma SH-SH con Cys, e interacción de Arg163.

#### **Vías de señalización.**

Los RPF producen cambios en las células eucariotas, y en el citoesqueleto, facilitando la migración celular y la síntesis de quimioquinas. Sus vías incluyen: la proteína G dependiente de la fosfolipasa C que descompone el fosfatidilinositol-bisfosfato en fosfatidilinositol-trifosfato y diacilglicerol. El IP<sub>3</sub> abre los canales de Ca<sup>++</sup>. DAG es un inductor de la quinasa-C y activa la GTPasa reguladora, RAS, que activa a RAF, una Ser/Thr-quinasa. Así, ERK1 y ERK2 se activan. Las ERK fosforiladas activan a las quinasas que hacen actividad transcripcional. La unión al RPF activa el CD38, una ectoenzima de la membrana. Por el NAD<sup>+</sup>, moléculas entran al citoplasma, y aquel, se convierte en ADP ribosa cíclica, un mensajero para receptores de rianodina en el retículo endoplásmico.

#### **Efecto de los PF sobre las funciones de los RFc de la IgG en los PMN humanos.**

Los PMN participan en la fagocitosis y la liberación de ROS, que se generan por los RFcy. Los PMN poseen 2 clases de RFcy, los RFcyII y RFcyIII, RPF bacterianos, como el N-formil-methionil-leucil-phenilalanina (FMLP). La incubación de los PMN con el FMLP inhibe los RFcys. Esto se explica, por la caída de la expresión de los RFcyII y RFcyIII en la membrana, que ocurre 30 minutos después.

#### **Receptores para citoquinas.**

Se agrupan en 6 familias:

- 1): de la superfamilia de las inmunoglobulinas: con varios dominios extracelulares del tipo Ig. Ejemplos: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-16;
  - 2): de factores de crecimiento hemopoyéticos: son de la familia de receptores  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Ejemplos: IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos) y G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos). El receptor para el GM-CSF está en los PMN, entre 300 y 2800 por célula con alta afinidad (199 kDa). Los progenitores mieloides, eritrocitos, CD, megacariocitos, células plasmáticas, LT, células endoteliales, eosinófilos, MØ, monocitos y células mieloides leucémicas los expresan con afinidad intermedia (10 a 40 kDa) y el resto de baja afinidad (<2 kDa);
  - 3): **familia de interferones**: tienen receptores  $\alpha$  y  $\beta$ . Ejemplos: INF- $\alpha$  y  $\beta$  y el INF- $\gamma$ ;
  - 4): **familia del factor de necrosis tumoral**: sus miembros se caracterizan por un dominio rico en cisteínas. Ejemplos: FNT- $\alpha$ , FNT- $\beta$ , y CD40;
  - 5): **familia de quimioquinas**: son proteínas de membrana, con 7  $\alpha$ -hélices en la bicapa lipídica con proteínas de señalización triméricas (proteína G) que unen GTP. Ejemplos: IL-8, RANTES y PAF (factor activador de plaquetas), y,
  - 6): **factores de crecimiento transformante (TGF)**: son los TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . La mayoría de los receptores para citoquinas son del grupo 2. Tienen una proteína de membrana, con un dominio extracelular CCCC (4 cisteínas cercanas) y el motivo WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser). La porción transmembrana una cola con tirosinas para fosforilar.
- Los receptores poseen 2 proteínas: una  $\alpha$ , que es específica de la citoquina, sin enviar señales, y, una  $\beta$ , transductora de señal, que no es específica de una citoquina, sino compartida por otras, lo que explica la redundancia y el antagonismo. La  $\beta$  posee motivos CCCC y WSXWS. Los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF, poseen la misma cadena  $\beta$  (KH97). Las 3 citadas, provocan redundancia: proliferación de eosinófilos y desgranulación

de basófilos. Las 3 compiten por la unión de cadenas  $\beta$  con las  $\alpha$  de cada receptor (efecto antagónico). El receptor de la IL-2 tiene 3 cadenas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y son el receptor de alta afinidad; las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , el de intermedia, y la  $\alpha$  sólo uno de baja afinidad. Las mutaciones de la  $\gamma$  del receptor de la IL-2 son la base molecular de la inmunodeficiencia grave combinada ligada al X (IDGC), lo que no pasa con las  $\alpha$  y  $\beta$ . Ello es porque la  $\gamma$  del receptor de la IL-2 forma parte del receptor para las IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, y se llama gamma común ( $\gamma_c$ ). El receptor de la IL-15 comparte las  $\beta$  y  $\gamma$  con el receptor de la IL-2. La  $\alpha$  del receptor de la IL-13 es igual a la  $\alpha$  del receptor de la IL-4. (181-182).

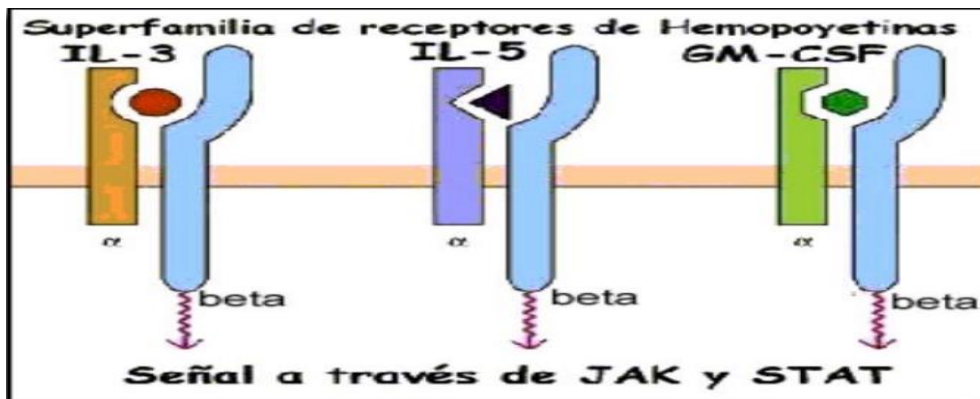


Fig. 23: Receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF.

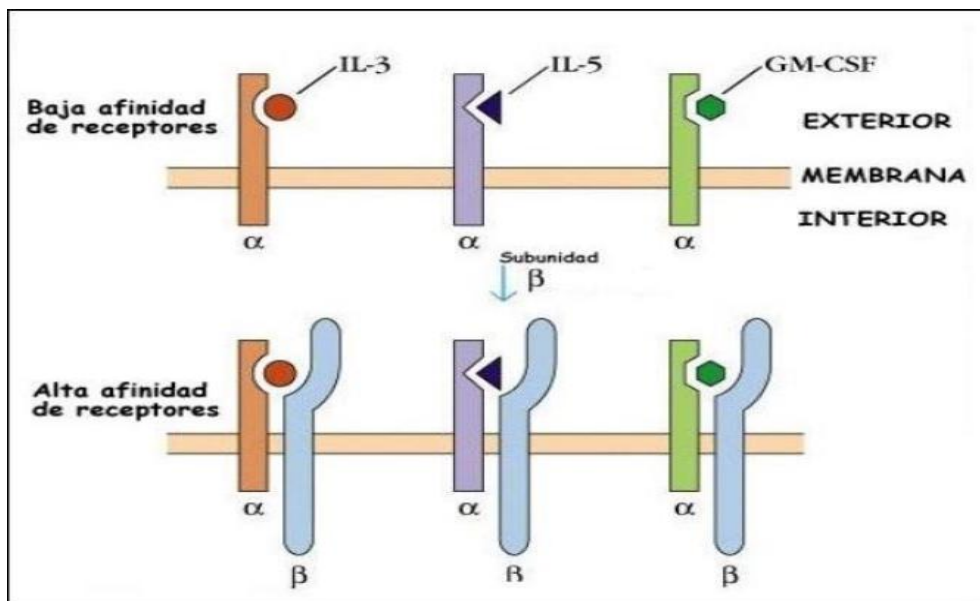


Fig. 24: Receptores de Clase I.



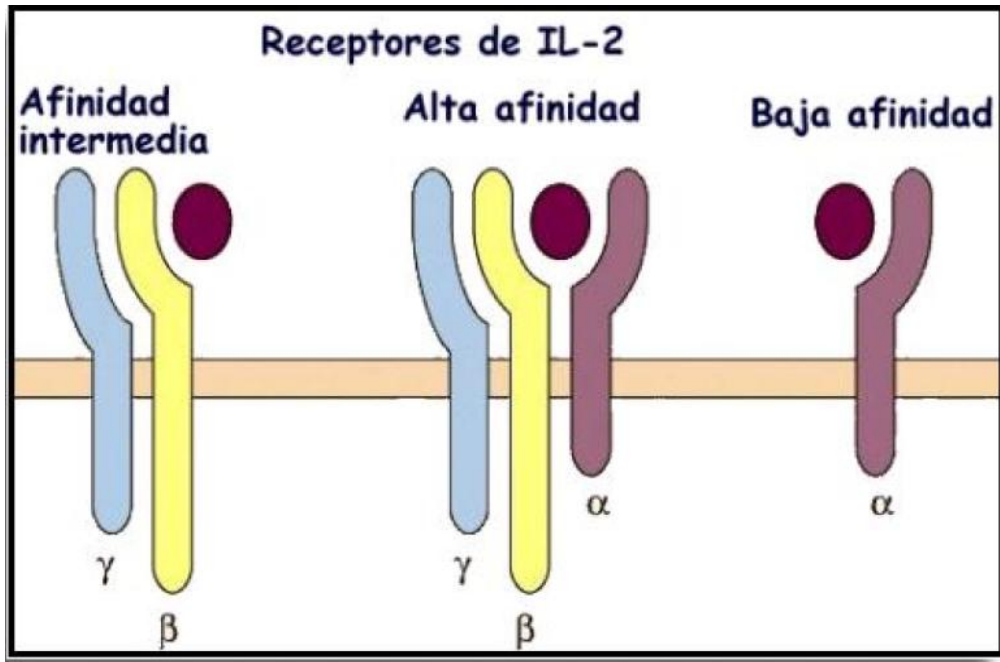


Fig. 25: Afinidad de los receptores de IL-2.

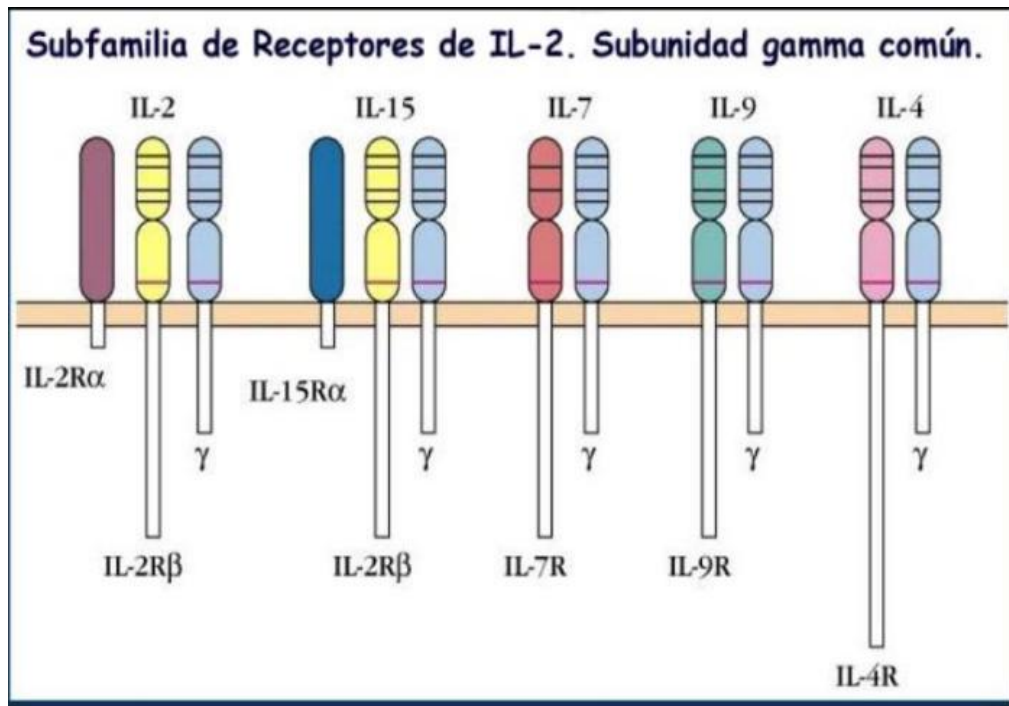


Fig. 26: Subunidad  $\gamma$ -común de los receptores de IL-2.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

1): la citoquina dimeriza a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor y las quimioquinas a sus receptores, lo que acerca sus colas citoplasmáticas; 2): las JAK-quinasas se unen a las colas del receptor, y se activan; 3): las JAK se autofosforilan y fosforilan a tirosinas de las colas del receptor; 4): proteínas STAT (transductor de señal y activador de transcripción) se unen a las tirosinas fosforiladas de las colas del receptor; 5): las JAK fosforilan a las STAT; 6): éstas así, pierden su afinidad por las colas del receptor, y forman dímeros entre sí; 7): las libres sirven para unir monómeros de STATs, y, 8): los dímeros de STAT fosforilados van al núcleo, donde activan la transcripción de genes, al unirse a secuencias en 5'.

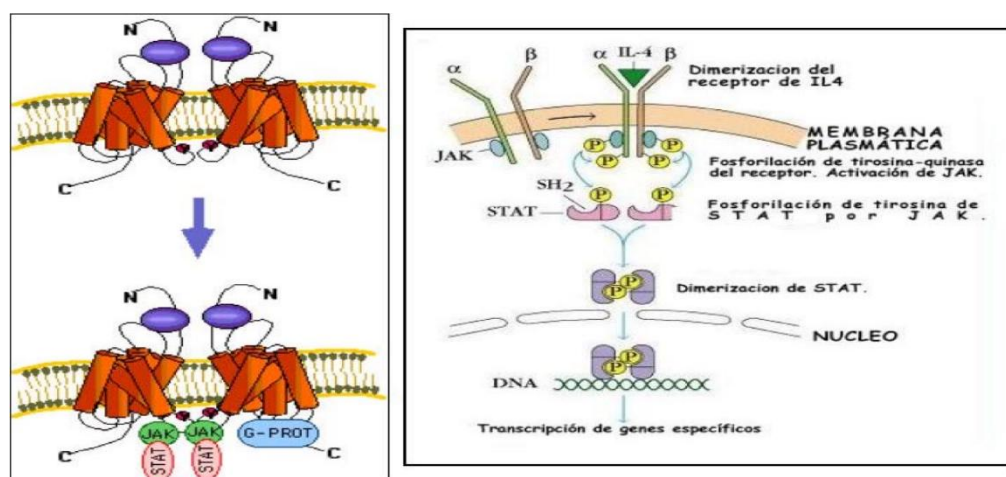


Fig. 27: Transducción de señales (ver texto).

### Los receptores de las NKC.

Son células de la **RIC** y la identificación de sus receptores contribuyó al entendimiento de su reactividad y especificidad. Se activan al reconocer células ajenas o células alteradas, por los CD16, CD2, CD28 y CD161. Células alteradas en la expresión del CMH-clase I, son susceptibles a las NKC al ligarse sus activadores. La citotoxicidad está regulada por inhibidores, que reconocen al CMH-clase I y, frenan lálisis de células normales. Los inhibidores son los KIR, Ly49, el CD94/NKG2 y el KLRE1. Los receptores activadores e inhibidores son de la superfamilia de la Ig y de lectina tipo C.

### Receptores activadores.

Las NKC destruyen células "blanco" que carecen del CMH-I apropiado. Para su acción se acoplan sus activadores con el ligando de la célula "blanco". Este es el estímulo requerido para su actividad citotóxica. Los activadores son: los CD16, CD2, CD28 y CD161, las 3 primeras del super-gen de la Ig y la última es una lectina-C.

### CD16.

Es un receptor de membrana que con el CD56 la diferencian de los LT, que son CD16-CD56+. Se llama RFcyIII o RFcyIIIA o como Ly-17. Este polipéptido glicosilado con 21 aminoácidos en su tallo citoplásmico, se expresa en el 80% a90% de las NKC humanas y de ratón; se detecta en MØ y en PMN. En el humano, se codifica en el cromosoma 1. El CD16

permite ADCC que destruye a la célula “blanco” cubierta de IgG. Luego, el CD16 inicia las señales, con incremento del Ca<sup>++</sup> intracelular y la secreción del FNT- $\alpha$ , perforinas, granzimas y granulolisinas, responsables de la citólisis.

#### **CD2.**

Es la LFA-2 o Ly-37, una glicoproteína de membrana. Su ligando es el CD58, que se asocia con la activación/coestimulación y adhesión.

#### **CD28.**

Es una glicoproteína homodimérica unida por SH-SH que se une a los ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Es un receptor de señalización intracelular para proliferación, producción de INF- $\gamma$  y destrucción de células tumorales.

#### **CD 161 (NKR-P1).**

Tres genes que la codifican se identificaron en el ratón y la rata: los NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1C. Sólo uno de ellos está en las NKC humanas. Son lectinas-C, homodiméricas, de 80 kDa, unidas por SH-SH, en la membrana de las NKC y subclases de LT. Se expresan en el cromosoma 6 del ratón, en el 12 humano y en el 4 de la rata, en la región del “gen del complejo NK”. Los NKR-P1C o CD161c se conocen como NK1.1 o Ly-55. Con monoclonales para NKR-P1 de las NKC humanas, se vio que activan o inhiben, y se asume que hay isoformas humanas. El NKR-P1B tiene ITIM, responsable de la inhibición; así, los NKR-P1 inhiben más que activan a las NKC.

#### **Otros receptores activadores.**

Son los citotóxicos naturales, o los NKp46, NKp44 y NKp30 o 1C7, codificado por el gen homónimo en la región del CMH clase III. Los NKp46 y NKp30 son únicamente expresados por las NKC, pero sus ligandos se desconocen. El receptor 2B (CD244 de las NKC de ratón y humano) induce la lisis de células CD48<sup>+</sup>. El receptor DNAM-1 con 2 dominios Ig, se expresa en las NKC, genera citotoxicidad y citoquinas luego del contacto con tumores.<sup>(183-184)</sup>

#### **Receptores inhibidores.**

Los tumores murinos que carecen del CMH-clase I, son atacados por las NKC, in vitro y/o in vivo. Esta es la hipótesis de la “pérdida de lo propio”, que establece que las NKC detectan en la célula “blanco” moléculas del CMH-I anormales e inician su eliminación. La pérdida del CMH-I ocurre en malignidades o en la infección viral. Líneas tumorales como la K562 (leucemia mielocítica crónica), Molt 4 (leucemia linfoblástica aguda) o Daudi (linfoma de Burkitt), se usan como “blanco” para las NKC, al no tener CMH-I. La “pérdida de lo propio”, no excluye la posibilidad de que células con CMH-I normales sean destruidas por las NKC, pero sólo ocurre con células de otro individuo. Hay células que sin el CMH-I son resistentes a las NKC, por la falta de ligandos para la unión de activadores y el inicio de la transducción de señales. En la hipótesis de “un receptor inhibidor”, se supone que las NKC discriminan alelos del CMH-I, y que se dan señales que inhiben la lisis. Los más importantes son: los Ly49, KIR, CD94/NKG2 y KLRE1, que se unen al ligando, fosforilan los ITIM's, y activan fosfatasa y señales intracelulares.

#### **KIR.**

Definidos como p50 y p70, se bautizaron como KIR. Son importantes en el reconocimiento del CMH-I propio y proteger a las células normales de la lisis por las NKC. Son glicoproteínas de la superfamilia de las Ig y poseen gran polimorfismo. Se codifican en el cromosoma humano 19 y el número de loci se desconoce, pero se estima en 10 los miembros de la familia aunque sólo 2 se identificaron. El KIR2D con 2 dominios Ig y el KIR3D con 3

dominios. Los sufijos 2D y 3D subdividen las moléculas en 2 (p58/p50) ó 3 (p70/p40) dominios. Se clasifican por sus dominios cortos o S (que inhiben) y largos o L (que activan). Así, hay KIR con dominios L como KIR2DL (o p58) y KIR3DL (o p70) con 2 secuencias ITIM y receptores KIR con dominios S como KIR2DS (o p50) y KIR3DS, carentes de ITIM y con aminoácidos que los hace activar que inhibir. Tanto KIR2D y KIR3D son monómeros a excepción de la glucoproteína KIR3DL-NKAT4 que puede ser monómero u homodímero unido por SH-SH. Los KIR2DL y KIR2DS reconocen alelos HLA-C, mientras que el KIR3DL reconoce HLA-A y B. Las NKC humanas poseen 2 o más KIR, y hay homólogos en primates. La inhibición reside en los ITIM, que tiene una secuencia de I/VxYxxL (x es cualquier aminoácido), y que al contacto con el CMH fosforila la tirosina y recluta la tirosina-fosfatasa (SHP-1). Los KIR son fosforilados en ausencia del ICAM, y de re arreglos del citoesqueleto (actina). Así, bloquean la activación temprana en los contactos de la NKC con sus “blancos”. **Ly49 (KLR)**. Este receptor rebautizado Ly49A, fue el primero de las NKC definido a nivel molecular y reconoce al CMH-I en el H-2Dd y H-2Dk del ratón, que inhibe a las NKC. Células no-NKC transfectadas con un ADNc Ly49A se adhirieron a células blanco transfectadas H-2Dd. Los Ly49 murinos son glicoproteínas tipo II, de las lectinas tipo C, codificados por 9 genes del cromosoma 6 del ratón, o “gen del complejo NK”. Están en la membrana de la NKC y del LT como homodímeros. El Ly49 interactúa con H-2Dd por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  y requiere de la  $\beta 2$ -microglobulina. Receptores como Ly49A, Ly49C, Ly49G2 y Ly49I, tienen ITIM, que inhibe la citólisis por las NKC. El Ly49C reconoce al CMH-I en sus haplotipos d, b, k y s. Ly49G es específico para Dd y Ld. El Ly49D carece de ITIM, y es un activador de la citotoxicidad asociado a DAP12. Ly49A, Ly49C y Ly49G2 se expresan en las NKC, en un 20%, 40% y 45%, respectivamente, en ratones B6(C57BL/6J, H-2Db). Cerca del 80% de las NKC poseen uno de los 3 receptores. En humanos, los genes homólogos Ly49 no están identificados.

#### **CD94/NKG2 (KLR).**

Los CD94/NKG2, de las NKC humanas y LT, son lectinas tipo C. Difieren de los KIR en estructura y especificidad, pero inhiben a las NKC. El CD94 es una glicoproteína que reconoce haplotipos HLA-A, B o C. Su cola es de 7 aminoácidos, sin función de señalamiento, y carece de los ITIM o ITAM. Está asociado al NKG2, y forman un receptor que da la señal intracelular. Son heterodímeros unidos por SH-SH, con una unidad compuesta por CD94 unido a una glicoproteína codificada por el gen NKG2. El CD94 es codificado por un solo gen, y el NKG2 por 4 genes, los NKG2A, NKG2C, NKG2E y NKG2D/F, además de NKG2B (una variante del NKG2A). Los genes de CD94 como de NKG2 están en el cromosoma 12p (“gen del complejo NK” humano). Los NKG2 no se expresan en la membrana, sólo si se unen a CD94. Así, CD94 es “chaperón” para el transporte de NKG2 a la superficie y estabilizar la molécula. El CD94/NKG2A reconoce al HLA-E. La lisis de las NKC a las CD autólogas inmaduras (baja expresión del CMH), por este receptor, señala la interfase entre la **RIC** y la **RIA**. Varios NKG2 contienen ITIM, a excepción de NKG2C, que carece de ITIM o ITAM. El CD94/NKG2 humano y el de ratón Ly49 reconocen CMH-I y son lectinas, y se asume que CD94/NKG2 es el homólogo humano de Ly49. Los homólogos de CD94 y NKG2 humanos, en rata, codifican genes en el cromosoma 4 (“gen del complejo NK”).

#### **KLRE1.**

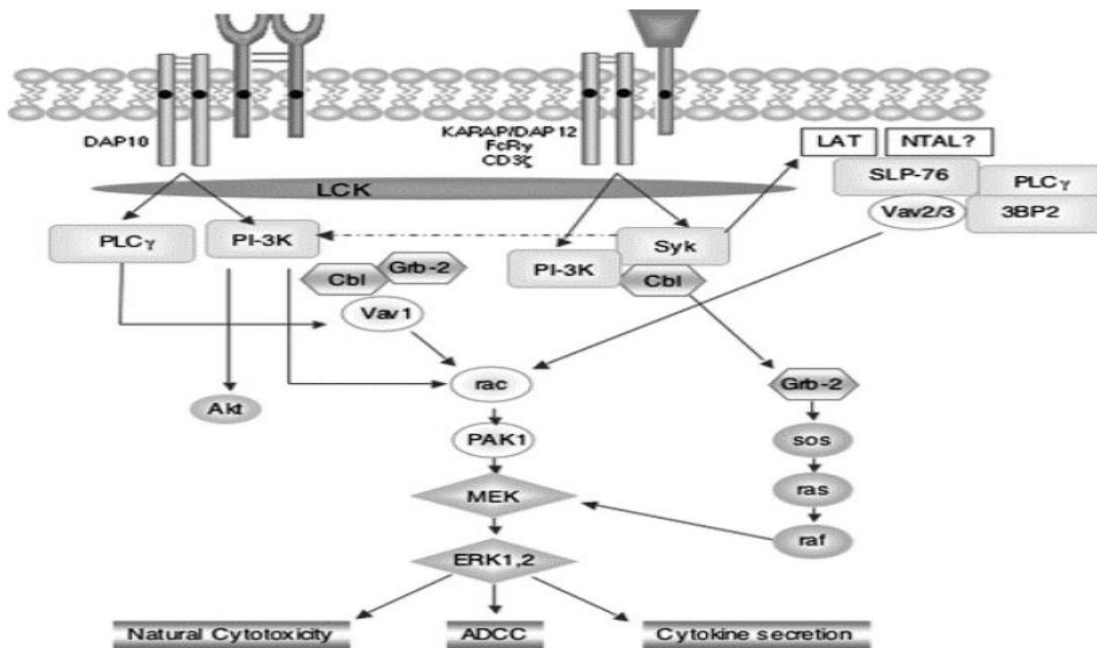
Otra lectina C como receptor de las NKC en murinos. Es transmembrana tipo II con una lectina COOH-terminal. No tiene ITIM ni aminoácido cargado positivamente, pero recluta

SH-P y es un receptor inhibitorio en las NKC.

**Receptores específicos para moléculas del CMH de clase I.**

Estos receptores con activadores e inhibidores, están en las células hematopoyéticas. Los ILT/LIR, PIR-B, CD66a y LAIR se hallan en los leucocitos, mientras que KIR, CD94/NKG2, RFcγIIB, CD22, CD72 y KLRG1, son más restringidos. Muchos genes del tipo Ig están en el cromosoma 19 humano (19q13.1-19q13.4), y sus homólogos en el 7 del ratón; a su vez, los genes para las lectinas están en el brazo corto del cromosoma 12 humano, y en el 6 del ratón. Las NKC poseen KIR, ILT2 y/o CD94/NKG2, mientras que los LB emplean RFcγIIB, CD72, PIR-B, ILT2 y CD22. Los receptores activadores, como el RcT y el RcB, son esenciales para reconocer antígenos extraños o patógenos. Poseen la unidad de unión al ligando y proteínas asociadas, como CD3ξ, cadena γ del RFcεI o DAP12, que señalizan. Los dominios citoplasmáticos tienen ITAM consecuencia Yx(2) Lx(6-8) Yx(2)L (x : aminoácido). Estos fosforilan sus ITAMs, por una quinasa-Src, reclutan las tirosina-quinasas ZAP70 y/o Syk que señalizan la fosforilación de proteínas, como fosfolipasa C-g (PLC-g), c-Cbl, p85 PI3K, Grb2, LAT, Vav-1 y Vav-2, Rho, p38 MAPK y ERK, que activan las funciones efectoras. Algunos activadores se asocian a la adaptadora DAP10 que tiene el motivo YxxM, que al fosforilarse recluta a la p85 de la PI3K, implicando a las proteínas Vav1, Rho, GTPasas y PLC. (Fig. 28)

Fig. 28. Señalización en las NKC. Vías de transducción de señales por los activadores acoplados a DAP10 o a adaptadores con dominios ITAM.



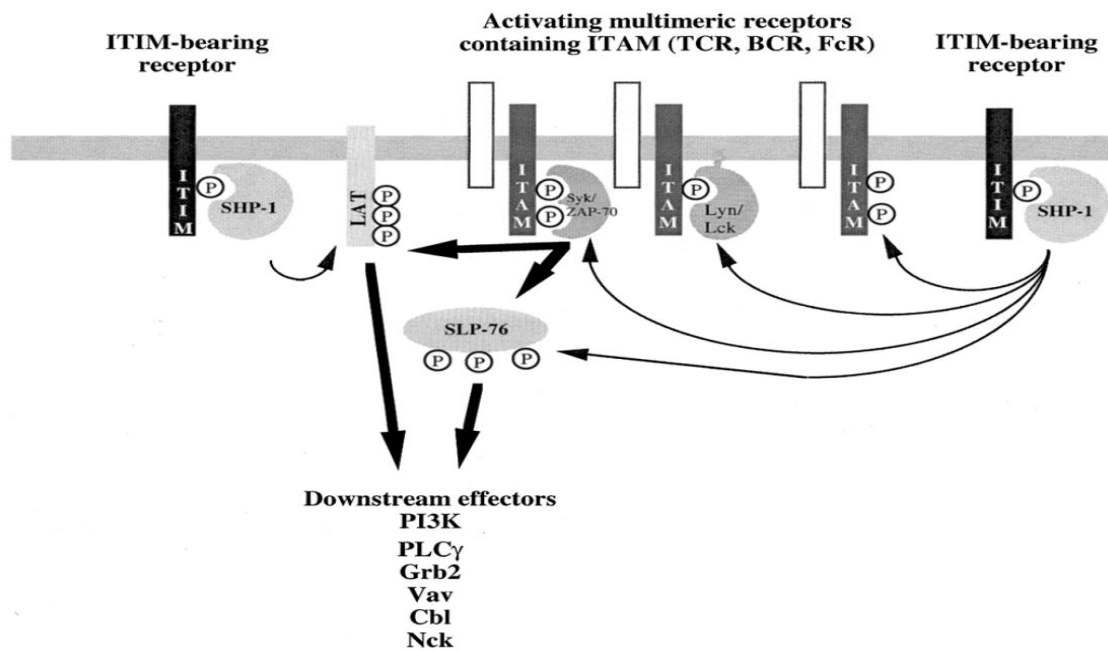


Fig. 29: Receptores con dominios ITIM. Luego de su activación, los ITIM se fosforilan y reclutan fosfatasas como SHP-1, cuyo sustrato son proteínas fosforiladas en las tirosinas. La desfosforilación de estas proteínas extingue las señales activadoras.

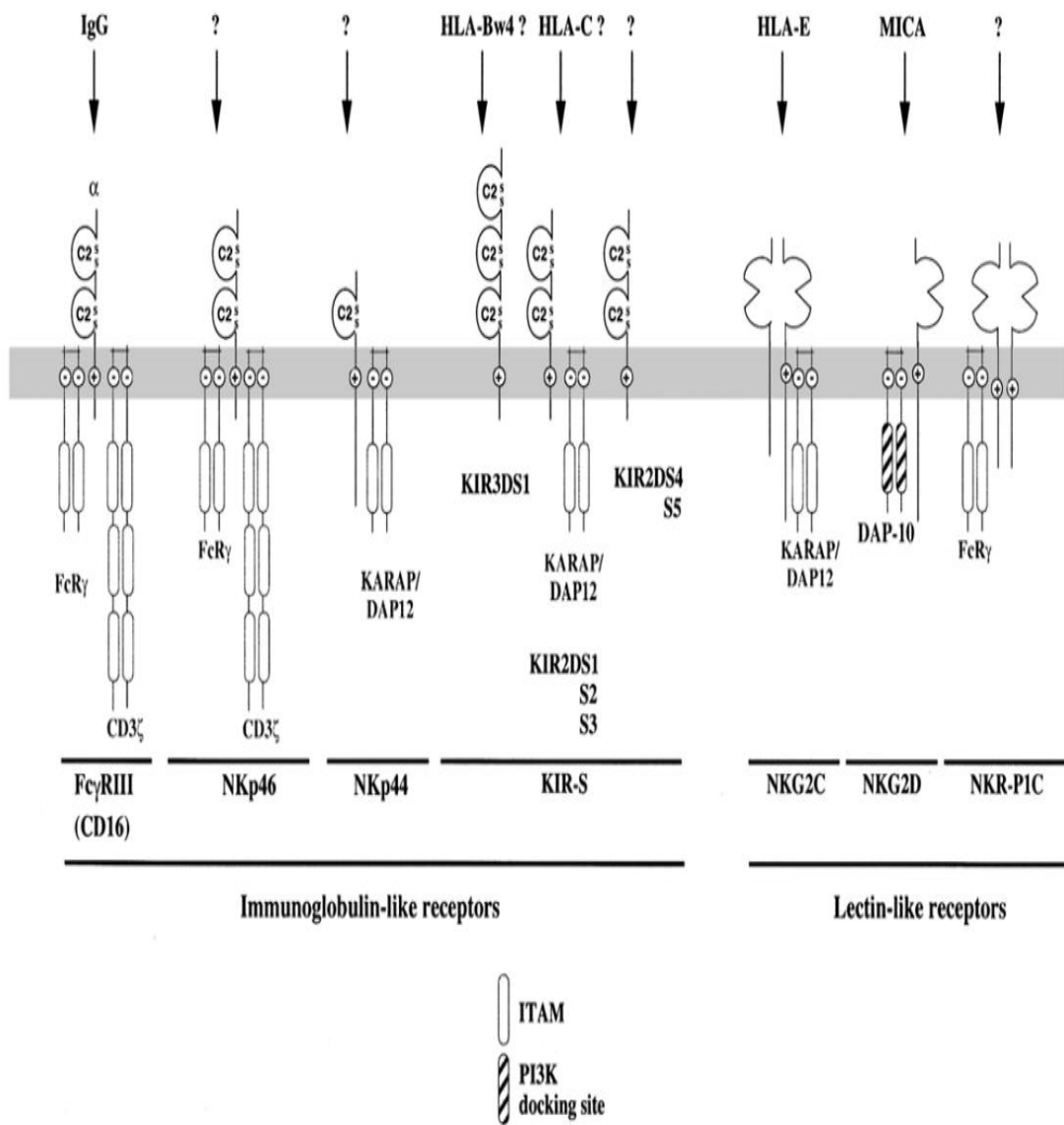


Fig. 30A. Receptores activadores expresados en las NKC humanas.



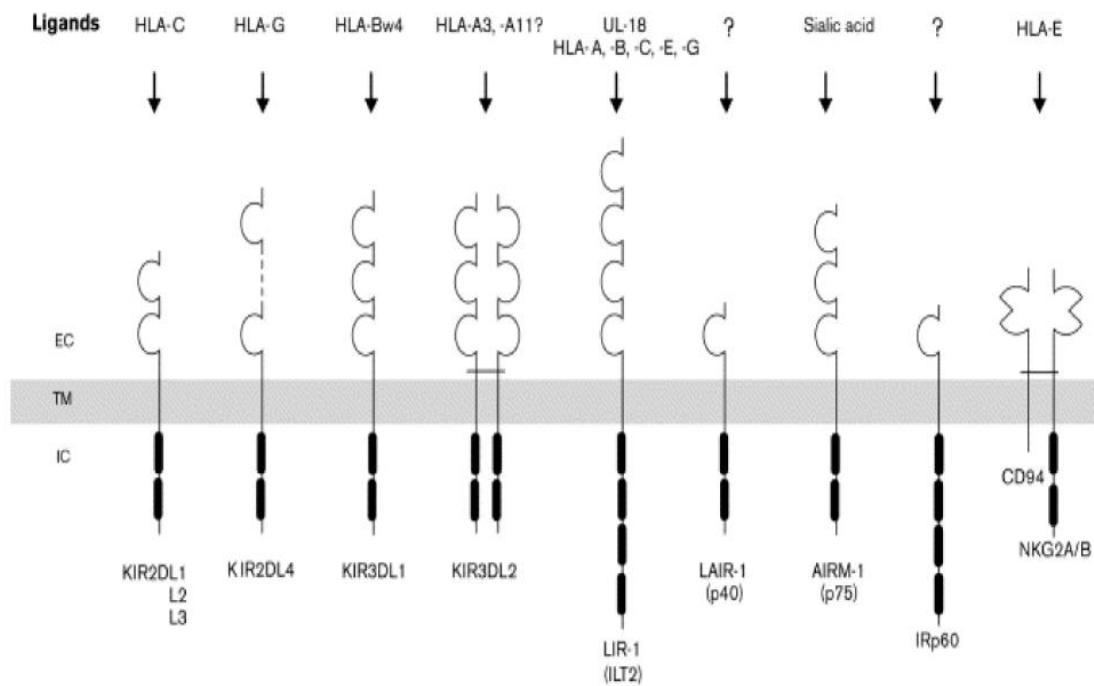


Fig.30B: Receptores inhibidores específicos para moléculas del CMH-

Receptor	Expresión	Ligando	Familia
<b>Receptores inhibidores y activadores</b>			
FcγR	Basófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos, células B y NK	IgG	Ig-SF
KIR	Células NK y subpoblaciones de linfocitos T	MHC de clase I	Ig-SF
ILT/LIR	Linfocitos y células linfoides	MHC de clase I, UL18 del citomegalovirus humano (HCMV) y ¿?	Ig-SF
CMRF35	Células NK, B, mieloides y subpoblaciones de linfocitos T	¿?	Ig-SF
CD94/NKG2	Células NK y subpoblaciones de linfocitos T	HLA-E	Lectina
NKR-P1	Células NK y subpoblaciones de linfocitos T	¿?	Lectina
SIRP	Células hematopoyéticas y no hematopoyéticas	CD47	Ig-SF
<b>Receptores inhibidores</b>			
LAIR-1	Linfocitos y células mieloides	¿?	Ig-SF
CD22	Células B	a. siálico	Ig-SF
SIGLECs	Células mieloides, linfocitos T, B, NK	a. siálico	Ig-SF
CD66a	Neutrófilos, células T y NK activadas, células epiteliales y endoteliales	CD66, CD62E	Ig-SF
KLRG1	Mastocitos, basófilos, células T y NK	¿?	Lectina
CD72	Células B	¿?	Lectina
<b>Receptores activadores</b>			
NKG2D	Células NK, mieloides y subpoblaciones de linfocitos T	MICA/B, ULBP1/2/3/4	Lectina
NKP46/44/30	Células NK	Hemaglutinina víricas, pp65 (HCMV) y ¿?	Ig-SF

I.

Tabla VII. Receptores activadores e inhibidores en los leucocitos humanos.

Tabla VIII. Principales características de los receptores KIR.

<b>KIR</b>	<b>Nombre alternativo</b>	<b>Función</b>	<b>Ligando</b>
2DL1	CD158a-forma larga, p58.1	Inhibidora	HLA-C <sup>Lys80</sup>
2DL2	CD158b-forma larga, p58.2	Inhibidora	HLA-C <sup>Asn80</sup>
2DL3	CD158b, p58.2	Inhibidora	HLA-C <sup>Asn80</sup>
2DL4	P49	Inhibidora (¿?)	HLA-G1
2DL5	Ninguno	Inhibidora	¿?
2DS1	CD158a-forma corta, p50.1	Activadora	HLA-C <sup>Lys80</sup>
2DS2	CD158b-forma corta, p50.2	Activadora	HLA-C <sup>Asn80</sup>
2DS3	Ninguno	Desconocida	¿?
2DS4	p50.3	Activadora	¿?
2DS5	Ninguno	Desconocida	¿?
3DL1	p70, NKB1	Inhibidora	HLA-B <sup>Bw4</sup>
3DL2	p140	Inhibidora	HLA-A3, A11
3DS1	Ninguno	Desconocida	¿?

#### **ILT/LIR/LILR.**

Son del super gen de las Ig con 4 dominios extracelulares Ig, excepto ILT3 con 2, y sus 13 genes son cercanos a los de KIR en el cromosoma 19q13.4. Posee moléculas inhibidoras (con 2 ó 4 ITIMs citoplasmáticos), junto a las activadoras del RFcyI con ITAM; el ILT6 es soluble. Se expresan en las NKC, LT, monocitos, MØ, CD, LB y PMN. Tienen hasta 15 alelos del ILT5. En los ratones, hay 2 receptores homólogos a los ILT, (PIRy gp49), que tienen inhibidores y activadores. Los inhibidores son ILT2 e ILT4; el ILT2 está en los LB, MØ, LT y NKC, pero el ILT4 sólo en monocitos/MØ. Reconocen al CMH-I, y, el ILT2 interactúa con la proteína del citomegalovirus humano (CMVH) UL18, homóloga del CMH-I, con 1000 veces más afinidad que la del CMH-I. Como en los LT-KIR+, LIR1 está en los de memoria y se expresa por la estimulación antigénica. El reordenamiento del RcT de los LT-LIR1+ es más diverso que el de los LT-KIR+ porque el LIR1 precede a la expresión de los KIR inhibidores en los LT.

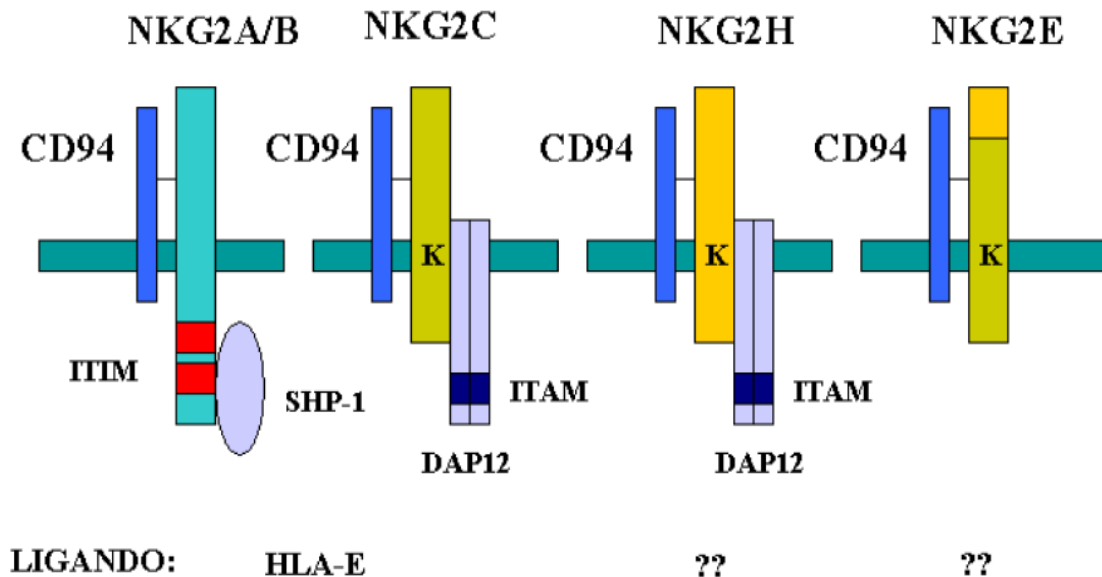
Tabla IX. Principales características de los receptores LIR.

<b>LIR/ILT</b>	<b>Nombre alternativo</b>	<b>Señalización</b>	<b>Ligando</b>
ILT2	LIR1, MIR1, CD85	4 ITIMs	HLA-A, B y G1, UL18(HCMV)
ILT4	LIR2, MIR10	3 ITIMs	HLA-A, B y G1
ILT5	LIR3, HL9	4 ITIMs	¿?
LIR8		2 ITIMs	¿?
ILT3	LIR5, HM18	3 ITIMs	¿?
ILT1	LIR7	FcR $\gamma$	¿?
ILT7		FcR $\gamma$	¿?
LIR6a		FcR $\gamma$	¿?
ILT8		FcR $\gamma$	¿?
ILT6	LIR4, HM31, HM43		¿?

Tabla X. Principales características de los receptores/coreceptores activadores no específicos para las moléculas del CMH.

<b>Receptor</b>	<b>Dominio extracelular</b>	<b>Proteína adaptadora</b>	<b>Ligando</b>
NKp46	2IgC	CD3 $\zeta$ /Fc $\epsilon$ RI $\gamma$	Hemaglutinina vírica y ¿?
NKp30	IgV	CD3 $\zeta$ /Fc $\epsilon$ RI $\gamma$	pp65 (HCMV) y ¿?
NKp44	IgV	DAP12	Hemaglutinina vírica y ¿?
2B4	IgC+IgV	LAT	CD48
NTBA	IgC+IgV		NTBA
DNAM-1	IgC+IgV		CD155; Nectina-2
NKp80	Lectina		¿?
CD59			¿?

Fig. 31. Características de los receptores CD94/NKG2.



### CD94/NKG2 y el HLA-E.

Reconocen al CMH-Ib-HLA-E, tanto en primates como en roedores. Se conocen los homólogos del CD94/ NKG2 de ratón y rata; en ratón su ligando es la molécula Qa-1b, homóloga al HLA-E. No se conoce el ligando de los CD94/NKG2E/H, pero sería diferente al del CD94/NKG2C, al diferir en su COOH-terminal. El HLA-E es un gen del CMH-Ib, de los tejidos humanos con baja expresión. Es poco polimórfico y posee un dimorfismo alélico, por una arginina HLA-ER (E\*0103) (-ER) o una glicina HLA-EG (E\*0101) (EG) en la posición 107. HLA-E se estabiliza en la membrana y va al retículo endoplásmico, por los transportadores de antígenos (TAP), a no átomos hidrofóbicos por la señal de moléculas HLA-I; la metionina en posición 2 del péptido es crítica, y, los alotipos HLA con treonina no estabilizan al HLA-E. Los péptidos estabilizantes están en los loci HLA-A y C, en un tercio de los HLA-B y HLA-G, y no en los HLA-F. La citotoxicidad con transfectantes de HLA-clase I, indica que HLA-E, se reconoce por el CD94/NKG2A, y que el péptido asociado al HLA-E hace el reconocimiento, por la afinidad de los heterodímeros CD94/NKG2. Otros estabilizan al HLA-E, por provenir de proteínas virales o endógenas, que actúan con el CD94/NKG2A e inhiben a la célula. La HSP-60 compite con los no átomos endógenos del CMH-I para estabilizar al HLA-E, y al no ser reconocido por el CD94/NKG2A, crea estrés celular, expresando HSP-60, y vulnera a las NKC. Un péptido BZLF1 del virus Epstein Barr (VEB) que acciona con el HLA-E no inhibe a la NKC. El péptido 35-44 del core del virus de la hepatitis C (VHC) estabiliza al HLA-E y es reconocido por el CD94/NKG2A inhibiendo a las NKC.<sup>(183-184-185).</sup>

### NKG2D.

Es otra lectina, de humanos y ratones, cuyo gen con el NKG2 está en el cromosoma 12. La homología entre éste y las NKG2 es limitada, y no se asocia con el CD94, sino que son homodímeros en las NKC, las NKT (natural killer T), LTCD8+ y MØ. La NKC de ratón posee isoformas de NKG2D que se unen a DAP12 o a DAP10, y señalizan por la PI3K. Así, ejerce activación o coestimulación. En las NKC y LT humanos, el NKG2D se une sólo a DAP10, e interacciona con el CMH-I. Los heterodímeros CD94/NKG2C reconocen al HLA-E. La citotoxicidad del CD94/NKG2C+ es poca comparada con la inhibición por

CD94/NKG2A+, a excepción de la activación de la señal del HLA-G67. El KLR activador CD94/NKG2C posee menor afinidad que su homólogo CD94/NKG2A, por los mismos ligandos, que se verificó por la cinética entre HLA-E y CD94/NKG2A y CD94/NKG2C. Los alelos del HLA-E son distintos en la membrana. El alelo HLA-EG se expresa más que el HLA-ER en células humanas transfectadas, y no se observan ULBP2, ULBP3, ULBP4, MICA y MICB, que se codifican por genes HLA-I próximos al locus B. Están en el epitelio intestinal, pero se inducen por estrés, infecciones virales o transformación tumoral. La proteína ULBP/RAET1 (UL-16 binding protein/ retinoic acid early induced transcript-1) tiene 10 genes relacionados, 6 codifican glicoproteínas funcionales y 4 son pseudogenes.

#### **Otros receptores de la superfamilia de las lectinas de tipo C.**

KLRG1 es un inhibidor con ITIM en la región citoplasmática, y está en LTCD4+, CD8+ y en las NKC, con ligando desconocido. Los LTCD8+ específicos para virosis crónicas (VEB, VCM) expresan este receptor.

#### **Regulación de la respuesta inmune por activadores específicos del CMH-clase I.**

Entre los LT y las NKC cada activador es independiente y genera la citotoxicidad y la producción de citoquinas. En los LT, los NKR son coestimuladores de una respuesta subóptima por el RcT. Los LTCD8+ con NKR son efectores y de memoria, son CD28-, con un repertorio del RcT restringido y telómeros cortos. Estos linfocitos NKR+ son coestimulados por activadores, como NKG2D, CD94/NKG2C o receptores de KIR. En las NKC, los KIR-DAP12, y, las tirosina-quinasa, estimulan la citotoxicidad y las citoquinas con la activación de la PLC- $\gamma$  y ERK. Los KIR en los LT que no expresan DAP12, no fosforilan a ERK, pero activan a JNK (cJun N-terminal kinase), que señala para moléculas coestimuladoras.

#### **Reconocimiento directo de una proteína vírica.**

La **RIC** tiene receptores para los PAMP, tales como los TLR. Las NKC, que expresan TLR3 y 9, reconocen al ARN de doble hebra (dsARN), secuencias ricas en CpG desmetiladas del ADN bacteriano y vírico, y responden a estos estímulos. En las NKC del ratón hay un activador, llamado Ly49H, que detecta a una proteína viral (m157) del CMVM. El carácter hereditario CMV-1159, que rige la susceptibilidad a la infección por CMVM en ratón, se identificó con el gen Ly49H160. Este Ly49 se asocia a DAP12, y en la defensa contra el CMVM, estimula a las NKC a agredir a la proteína m157. Este Ly49H-activador es una evolución del huésped y de evasión, contra la m157, pues se une al inhibidor Ly49I. Bajo la presión de las NKC Ly49H+ se inducen mutaciones del virus en m157, que no reconoce Ly49H. La proteína pp65 del CMVH es detectada por el receptor NKp30, que siendo activador, inhibe a la célula al disociar el receptor y su adaptado.

#### **Disminución de ligandos para receptores inhibidores específicos para HLA.**

El CMV disminuye la expresión del CMH para evadir a los LT. Así, las NKC son liberadas de los inhibidores para la clase I, y activan la citotoxicidad y las citoquinas. Los fibroblastos infectados con CMV resisten la lisis por las NKC, como mecanismo de evasión. Para escapar de las NKC, el virus mantiene los inhibidores activos, interfiriendo la expresión del CMH-I. El CMV escaparía de las NKC y LT, por moléculas de la presentación antigénica, pero que se ligan a inhibidores (HLA-E y HLA-C). Las proteínas US2 o US11 interfieren con las moléculas CMH-I. Otra evasión del CMVH son 2 proteínas: **a) UL-40 y CD94/NKG2A:** es un nonámero de la proteína del CMVH-UL40, idéntico al HLA-Cw03 que se une a HLA-E, y estabiliza su expresión. La UL40 durante la virosis preserva al HLA-E, contra las NKC que poseen el CD94/NKG2A. Se vió con fibroblastos infectados por una mutante de la cepa AD169 deficiente en UL40, más susceptibles a la lisis por NKC

CD94/NKG2A+. Para que el CMVH preserve al HLA-E, éste debería ser refractario a otros virus que inhiben al CMH-I (US2, US3, US6 y US11). El nonúmero de UL40 por HLA-E es independiente de TAP y resistente a US6. Tanto US2 como US11 preservan al HLA-E142, que, con el péptido de UL40, contribuyen a la expresión de HLA-E en la membrana durante la infección y protegen a los fibroblastos infectados de la lisis mediada por NKC CD94/NKG2A+. Un péptido de la HSP-60, de células con estrés, estabiliza al HLA-E, e impide su unión al CD94/NKG2A, y la célula es susceptible a la lisis, y, **b) UL18-ILT2:** es homóloga al CMH-I, se une a la  $\beta 2$ -microglobulina, un péptido y se halla en la membrana. Se une al inhibidor ILT2 con más afinidad que el CMH-I. La menor lisis por las NKC de las células infectadas por CMVH es independiente de la UL18, y ésta incrementa la actividad NKC. Ciccone, publicó que los LTCD8<sup>+</sup> lisan células UL18<sup>+</sup>, dado que la unión UL18-ILT2 estimula a los LT. No todas las variantes de UL18 se unen al ILT2, y, que UL18 sea ligando de otro activador de monocitos/MØ, aclara incógnitas sobre la infección. <sup>(186-187-188)</sup>.

#### **Incremento de la expresión de ligandos propios para activadores de las NKC.**

El NKG2D está implicado en la respuesta al CMVH. La infección aumenta los MICA/B y ULBP, ligandos del receptor NKG2D, y el receptor, que se expresa en los LTCD8<sup>+</sup> específicos para CMVH, es un coestimulador para la citotoxicidad y las citoquinas mediadas por el R<sub>c</sub>T. La glicoproteína temprana del CMVH-UL16, retiene a las MICB, ULBP1 y ULBP2, inhibiéndolas en la membrana e interfiriendo al NKG2D; al revés, MICA, ULBP3 y ULBP4 son resistentes a UL16. Los fibroblastos infectados con una mutante de AD169, no expresa la UL16 y son sensibles a las NKC. En el CMVM, las m152, m155 y m145 disminuyen los ligandos del NKG2D murino.

#### **Receptores del CMH-clase I en la artritis reumatoidea (AR).**

La tolerancia del sistema inmune, se basa en receptores leucocitarios inhibidores, y las NKC, al estar bajo el control de estos receptores, contribuyen a la tolerancia de algunos LT. Las enfermedades autoinmunes exhiben una pérdida de la tolerancia a los antígenos propios. No hay ratones deficientes en inhibidores específicos para el CMH-I, sí los hay en los LB (CD22 y RFcyIIB). Estos ratones son más sensibles a una patología autoinmune, pues hay un desequilibrio entre las señales activadoras e inhibidoras. La AR es una inflamación crónica con una hipertrofia sinovial, la formación del pannus, la destrucción del cartílago y del hueso yuxtaarticular. El pannus tiene MØ y fibroblastos que proliferan, secretando metalo-proteasas que degradan el cartílago y la matriz extracelular. Se producen FNT- $\alpha$  e IL-1, que perpetúan la inflamación. Los LT promueven el INF- $\gamma$  y el FNT- $\alpha$ . Las células de la AR expresan CMH-I, y se relacionan con la autorreactividad de los LT-CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. En los sanos, los LTCD4<sup>+</sup> expresan CD28 que promueve coestimulación, activación y previene su apoptosis. Los LTCD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, está expandida en la AR, no expresan el ligando de CD40, producen INF- $\gamma$ , granzima B y perforina, y son citotóxicos. Los LTCD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en la diabetes tipo 1, podrían tener un papel en su autoinmunidad. Nakewana señaló que los LT CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, y no los LTCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, poseen receptores tanto activadores como inhibidores para el CMH-I; los primeros son de KIR (KIR2DS2), y los segundos de NKG2A. Esto se relacionaría con la autorreactividad de los LTCD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y su expansión oligoclonal. Yen acotó que tener el gen KIR2DS2 aumentaba las vasculitis en la AR. Los alelos del CMH-I-clase C, ligando de KIR2DS2, difieren en la AR, lo que está implicado en el daño vascular. Hay una asociación entre los activadores de KIR y la artritis psoriásica, por los genes KIR2DS1 y/o KIR2DS2, pero sólo si no expresan los ligandos CMH-I para sus KIR2DL1 y KIR2DL2/3. En la esclerodermia, el

fenotipo KIR tiene KIR2DS2 activador, sin el KIR2DL2 inhibidor. Groh señaló que los LTCD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> expresan NKG2D, un coestimulador que no está en los LTCD4<sup>+</sup>. El NKG2D se induce por el FNT- $\alpha$  y la IL-15, de la sinovial inflamada. Hay autoanticuerpos contra los KIR, que afectan la función al bloquear o aumentar la señal del CD45, la  $\beta$ 2-microglobulina o el CTLA-4. Los autoanticuerpos anti-KIR2DL, de un 30% de la AR, bloquean el receptor disminuyendo su inhibición, y activan las NKC o LT. Los LIR, son activadores e inhibidores de la sinovial de la AR, y no de la artrosis, pues regulan la activación de los receptores de la inflamación.<sup>(189-190)</sup>.

**LA VIGILANCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES.** Las NKC carecen de receptores para un antígeno y son parte de la RIC, capaces de reaccionar sin exposición previa al patógeno. En ratones y en humanos, las NKC juegan un papel en la inmuno-vigilancia (“surveillance inmunológica”) para la muerte de las células tumorales, sin moléculas de adhesión ni péptidos antigénicos. Las células tumorales activan a las NKC y a las citoquinas, pues si no causan inflamación se ven como propias, y no activan a los LT. Liberan el FNT- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-10, que son proinflamatorias e inmunosupresoras. Sin receptores para antígeno, la lisis está mediada por los receptores alternativos NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30 y DNAM. NKG2D es un homodímero unido por SH-SH que detecta a los ULBP y MICA, de las células tumorales. Las NKC y los MØ, tienen RFc, que a los anticuerpos, y lisan células por ADCC, con distinta afinidad, que puede ser de alta, intermedia y baja para la IgG. La afinidad está en el nucleótido 158 del gen que puede ser fenilalanina o valina. Los sujetos con RFcyIII (alta afinidad) responden mejor como se vió en el linfoma con Rituximab. El 15-25% con el alelo 158 Val/Val tienen una mejor respuesta anti-tumoral.

#### **LA EVASION DE LAS NKC POR LAS CÉLULAS TUMORALES.**

Las células neoplásicas derraman ligandos NKG2D solubles como señuelos para eludir la respuesta inmune. Estos ligandos se unen a los receptores de la NKC y activan una falsa respuesta, y la competencia por el sitio receptor. Es la evasión del cáncer de próstata, que evade a los LTCD8<sup>+</sup>, por perder la expresión del CMH-I.<sup>(191-192-193)</sup>.

#### **LA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER.**

Las NKC reconocen células diana cuando expresan antígenos no propios del CMH, por eso las infusiones de NKC autólogas no poseen efectos anti-tumorales. El uso de células alogeneicas de sangre periférica, sin LT, antes de la perfusión, evita la reacción injerto contra huésped. Por la escasez de NKC en la sangre, su número debe ser ampliado en el cultivo, lo que demanda tiempo. Más sencillo para conseguir un alto número de NKC puras es expandir las células NK-92, que crecen rápido en el cultivo. Se toleran bien, y hay respuestas anti-tumorales en enfermos con cáncer de pulmón, melanoma y linfoma. En el Sloan Kettering Cancer Center y la Universidad de Pensilvania, se vió que las infusiones de LT con un antígeno quimérico, que reconoce un antígeno de células de leucemia, inducían remisiones en la leucemia avanzada. Con los LT se aplicaría la misma tecnología que con las NKC y NK-92. En el Hospital Infantil de Boston, en coordinación con el Instituto del Cáncer Dana-Farber, los ratones inmunodeprimidos por los linfomas de la infección por VEB, un activador de NKC llamado NKG2D se fusionó con un Fc estimulante del anticuerpo VEB. La fusión NKG2D-Fc fué capaz de reducir el



crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia.

### **RESISTENCIA INNATA AL VIH.**

Investigaciones recientes sugieren que la interacción entre KIR-CMH-I podría controlar la **RIC** a las virosis, incluyendo el VIH-SIDA. Hay alelos de HLA como B57 y B27, que diferirían la progresión de VIH a SIDA. Los pacientes con estos alelos tienen cargas virales más bajas y una reducción más leve de los LTCD4+. Las NKC impondrían una presión inmune al VIH, como los LT y los anticuerpos, por eso el VIH muta para eludir a las NKC.

### **Reflexiones finales.**

El sistema inmune de los vertebrados es capaz de mantener un equilibrio entre la reactividad y la quiescencia. Por el análisis de los sistemas de receptores activadores e inhibidores de las células linfoides y mieloides, se asume que los ambos son útiles para iniciar, amplificar y terminar la respuesta inmune. La importancia de estos sistemas se detectó al ver una mayor susceptibilidad para la autoinmunidad en ratones deficientes de alguno de ellos. En la AR, la cronicidad es por los infiltrados linfocitarios, MØ y fibroblastos sinoviales, con receptores activadores y/o inhibidores y cuya disfunción generaría la inflamación crónica. Los receptores de las NKC son exclusivos y se encuentran en reposo como los NKp46 y los NKp30, mientras que otros no son exclusivos, y están en LT o LB o en células no linfoides, como el CD16, de los MØ, eosinófilos y PMN. Si las NKC se activan, aparecen el CD69 y el CD 137. Mantener el balance inhibición/activación, controlaría los mecanismos de evasión de la **RIC** por patógenos, y llevaría a pensar en estrategias para eliminar tumores, así como bloquear receptores que eviten el rechazo de los trasplantes. La citotoxicidad de las NKC está relacionada con células que han perdido o alterado su CMH-I, por enfermedades malignas e infecciones virales. Un inhibidor reconoce una región definida como KIR y Ly49, por ligandos polimórficos del CMH-I. Como hay ligandos para los activadores de las NKC en células normales, como el CD80 (ligando de CD28), de los MØ y CD, la activación de las NKC, está bajo un control negativo, evitando la destrucción de células normales. Aspectos de la biología de las NKC, como la especificidad de la activación, las bases moleculares de la expresión de receptores y la adquisición de reactividad ante la "pérdida de lo propio", quedan aún por resolverse. Finalmente, el papel de estas NKC en la **RIA** debe ser investigado, ya que las CPA y los LT poseen receptores comunes, y también ligandos para las NKC. Esto revelaría un papel para las NKC en el control de la **RIC** y **RIA**.

### **Bibliografía.**

- 1.- Roitt I.M., Delves P.J.: Inmunología. Fundamentos. Ed. Méd. Panamericana. Bs. Aires, 2003.
- 2.- Abbas A.J., Lichtman A.H.: Inmunología celular y molecular. Elsevier, Madrid, 2003.
- 3.- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S.: Tratado de Microbiología. Ed. Masson, Barcelona, 1996.
- 4.- Lahita R.G., Chiorazzi N., Reeves W.H.: Textbook of the autoimmune diseases. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2000.
- 5.- Fireman P.: Atlas de Alergia e Inmunología Clínica. Elsevier. Madrid. 2007.
- 6.- Alonso A.: Temas de Inmunoalergia. Tomos I al VI. Ed. CTM. Bs Aires. 1998 a 2006.

- 7.- Alonso A.: Fundamentos de alergia para el médico general. Ed. El Ateneo. Bs. Aires. 1996.
- 8.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H., Varela M.R.: Alergia atópica. Ed. H. Macchi. Bs. Aires. 1987.
- 9.- Alonso A.: Claves de la Inmunología. Ed. López. Bs.Aires. 1992.
- 10.- Playfair J.H.L., Chain B.M.: Inmunología en esquemas. Ed. CTM. Bs.Aires.2007.
- 11.- Alonso A.: Incógnitas de la alergia. Ed. Del autor. Bs.Aires. 2013.
- 12.- Medzhitov R.: A human homologue of the Drosophila Toll protein signal activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997;388: 323-324.
- 13.- Akira S. : Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*, 2003; 278: 38105- 38108.
- 14.- Lemaitre B. : The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996; 86: 973-983.
- 15.- Rock F L. : A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 588-593.
- 16.- Albiger B. : Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Int Med*, 2007; 261: 511-528.
- 17.- Takeda K. : Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003; 21: 335- 376.
- 18.- Trinchieri G.: Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 2007; 7: 179-190.
- 19.- Matsumoto M. : Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 2003; 171: 3154-3162.
- 20.- Shimazu R. : MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 1999; 189: 1777- 1782.
- 21.- Hawn T R.: A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*, 2003; 198: 2487-2489.
- 22.- Heil F. : The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*, 2003; 33: 2987-2997.
- 23.- Hacker H. : CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J*, 1998; 17: 6230-6240.
- 24.- Zhang D. : A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 2004; 303: 1522-1526.
- 25.- Brogdem K A. : Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature*, 2005; 3: 238-250.
- 26.- Villarruel R.: Péptidos Naturales Antimicrobianos : escudo esencial de la respuesta inmune. *Inv Salud*, 2004; 3: 170-179.
- 27.- Chalifoor A. : Direct bacterial protein PAMP recognition by human NKC cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* , 2004; 104: 1778-1783.
- 28.- Liu A Y. : Human defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol*, 2002; 118: 275-281.
- 29.- O'Neil D. : Expression and regulation of the human defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 1999; 163: 6718-6724.
- 30.- Selleri S. : Toll-like receptor agonist regulate B-defensin 2 release in hair follicle. *Br J Dermatol*, 2007; 156: 1172-1177.
- 31.- Matzinger P. : The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, 2002; 296: 301-305.
- 32.- Matzinger P. : An Innate Sense of Danger. *Ann NY Acad Sci*, 2002; 961: 341-342.
- 33.- Galluci S. : Danger Theory: The link between AIS and IDS?. *Int. Immunol*, 2001; 13: 114-119.
- 34.- Pierre-Y B. : Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future

- treatments. *Clinical Review*, 2003; 326: 262-266.
- 35.- Bochud P Y. : Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous in unable to mediate mycobacterial signaling. *J. Immunol*, 2003; 170: 3451-3454.
- 36.- Krechi S. : Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl J Med*, 2002; 347: 185-192.
- 37.- Ameziane N. : Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp-29-Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: 61-64.
- 38.- Akira S, Hemmi H.: Recognition of pathogen-associated molecular pattern by TLR family. *Immunol Lett*, 2003; 85(2): 85-95.
- 39.- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006 ; 124: 783–801.
- 40.- Akira S. : TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006; 311: 1–16.
- 41.- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. : Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2006; 413: 732-738.
- 42.- Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C.: Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, 1985 ; 42: 779-789.
- 43.- Burzyn D, Rassa JC, Kim D, Nepomnaschy I, Ross SR, Piazzon I. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol*, 2001; 78:576–584
- 44.- Carpenter S, O'Neill LA. : How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol*, 2007; 9 (8): 1891-1901.
- 45.- Doyle SE, O'Connell R. : Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than toll like receptor 4. *J Immunol*, 2003; 170: 3565-3571
- 46.- Foster S L, Medzhitov R. : Gene-specific control of the TLR induced inflammatory response. *Clin Immunol*, 2003; 130 (1): 7-15.
- 47.- Gay NJ. : *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 1991; 351: 355–356.
- 48.- Hagberg H, Peebles D, Mallard C.: Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002 ; 8: 30- 38.
- 49.- Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. : Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res*, 2001; 50: 315-321.
- 50.- Hayashi F, Smith KD. : The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001; 410: 1099-1103.
- 51.- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H. : A Toll like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000; 408: 740-745.
- 52.- Janeway CA, Jr, Medzhitov R.: Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol*, 1999; 10: 349-350.
- 53.- Johnson GB, Brunn GJ, Tang AH, Platt JL. : Evolutionary clues to the functions of the Toll like family as surveillance receptors. *Trends Immunol*, 2003; 24: 19-24.
- 54.- Carabello B.A, Vallejo J.G. : Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll like receptors?. *Chest*, 2002; 121: 1329-1336.
- 55.- Kurt-Jones EA, Popova L.: Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.*, 2000, 1: 398–401.
- 56.- Li X, Qin J Z.: Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med.*, 2005; 83 (4) :258- 266.
- 58.- Lien E, Sellati TJ. : Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.*, 1999; 274: 33419-33425.
- 59.- Ma Z, Li J, Yang L, Mu Y, Xie W, Pitt B, Li S. : Inhibition of LPS-and CpG DNA-induced TNF-response by oxidized phospholipids. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2004 ; 286: 1808-1816.
- 60.- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P.,. A human homologue of the *Drosophila* Toll

- protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997; 388: 394-397.
- 61.- Medzhitov R. : Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*;2001; 1:135–45.
- 62.- Mizel SB, : Induction of macrophage nitric oxide production by gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric toll-like receptor 5/toll like receptor 4 complexes. *J Immunol*, 2006; 170: 6217-6223.
- 64.- Nerren JR, Swaggerty CR., : Differential mRNA expression of the avian-specific toll-like receptor 15 between heterophils from Salmonella-susceptible and resistant chickens. *Immunogenetics*, 2009 ; 61 (1): 71-77.
- 65.- Ozinsky A, Underhill DM., : The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 97: 13766-13771.
- 66.- Rassa JC., : Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002: 99: 2281–2286.
- 67.- Takeda K; Akira S. : Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*, 2001; 6, 733-742.
- 68.- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD: Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*,2001 ; 13: 933- 940.
- 69.- Triantafilou K, . : Coxsackievirus B4- induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. *J. Virol*, 2004; 78: 11313–11320.
- 70.- Uematsu S, ..: Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med.*, 2006; 84.: 712-725.
- 71.- Yarovinsky F, Zhang D, : TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 2005; 308: 1626–1629.
- 72.- Zhang G, : Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*, 2001; 107:13-19.
73. Benoist C, Mathis D : Mast cells in autoimmune disease. *Nature*, 2002;420: 875-8.
- 74.- Schneider E , : Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends in Immunology*, 2002;23: 255-63.
- 75.- Tilley SL, Coffman TM, : Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*, 2001;108: 15-23.
- 76.- Soberman RJ, Christmas P : The organization and consequences of eicosanoid signalling. *J Clin Invest*, 2003;111: 1107-13.
- 77.- Cocks TM, Moffatt JD : Protease-activated receptors: sentries for inflammation? . *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003;21:103-8.
- 78.- Cirino G, Napoli C, Bucci M,: Inflammation coagulation network: are serine protease receptors the knot?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003; 21:170-2.
- 79.- Fiorucci S, Distrutti E : Role of PAR2 in pain and inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002; 23: 153-5.
80. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. : Biologically active oxidized phospholipids. *J Biological Chemistry*, 2000;274: 25189-92.
- 81.- Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM : Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Ann Rev of Biochem* , 2000;69: 419-45.
- 82.- Fukushima N, Ishii I, Contos JAJ, Weiner JA, Chun J : Lysophospholipid receptors. *Ann Rev of Pharmacology & Toxicology*, 2001;41: 507-34.
- 83.- Hla T, Lee M-J, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ : Lysophospholipids – Receptors revelations. *Science*, 2001; 294: 1875-8.
- 84.- Böckmann S, Paegelow I : Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J of Leukocyte Biology*, 2000;68: 587-92.
- 85.- Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM : Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Current Biology*, 2002;12: R 745-52.

- 86.- Schmaier AH : The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the rennin-angiotensin system. *J Clin Invest*, 2002; 109:1007-9.
- 87.- Ibelgaufts H : *COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia* (version 18.0) En:<http://www.copewithcytokines.de> (visitado: sept 2008).
- 88.- Ozaki K, Leonard WJ.: Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J of Biological Chemistry*, 2002;277: 29355-8.
- 89.- Luster AD : Chemokines – Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J of Med*, 1998; 338: 436-45.
- 90.- Witko-Sarsat V. : Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*, 2000;80: 617-53.
- 91.- Juliano RL. : Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin superfamily members. *Ann Rev of Pharmacology & Toxicology*, 2002;42: 283-323.
- 92.-Kubes P.: The complexities of leukocyte recruitment. *Seminars in Immunology*, 2002; 14: 65-72.
- 93.- Marshall D, Haskard DO : Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now?. *Seminars in Immunology*, 2002;14: 133-40.
- 94.-Muller W. A: Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation*, 2002;85: 521-33.
- 95.-Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J of Physiology*, 2002;283: R7-R28
- 96.-Shimaoka M, Takagi J, Springer TA : Conformational regulation of integrin structure and function. *Ann Rev of Biophysics & Biomol Structure*, 2002;31: 485-516.
- 97.-Weber C : Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J of Mol Med*, 2003;81: 4-19.
- 98.- Lekstrom-Himes JA, Gallin JI : Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Eng J Med*, 2000;343: 1703-14.
- 99.- Cook-Mills JM, Deem TL : Active participation of endothelial cells in inflammation. *J of Leukocyte Biol*, 2005;77: 487-95.
- 100.- Elghetany MT, Lacombe F : Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy,race, and stress. *J.Leukocyte Biol*, 2003; 75: 157-62.
- 101.-Baumann H, . : The acute phase response.*Immunology Today*, 1994,15: 74-80.
- 102.- Steel DM.,: The major acute phase reactants:C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*,1994;15: 81-8.
- 103.- Hack E, Wolbink G-J, Schalkwijk C : A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunology Today*, 1997;18: 111-5.
- 104.-Tilg H, Dinarello CA, Mier JW: IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today*, 1997; 18:428-32.
- 105.-Hasday JD, Singh IS: Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress & Chaperones*, 2000;5: 471-80.
- 106.- Libby P : Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002;420: 868-74.
- 107.-Bellotti V.:Molecular mechanisms of amyloidosis.*New EngJ Med*, 2003;; 349:583-96.
- 108.- Walport MJ : Complement. *N.Eng.J.Med.*,344: 1058-66 (1<sup>a</sup> parte), 344:1140-4 (2<sup>a</sup> parte).

- 109.-Mastellos D, Lambris JD : Complement: more than a 'guard' against invading pathogens?. *Trends in Immunology*,2002;23: 485-91.
- 110.-Gerard C. : Complement C5a in the sepsis syndrome – Too much of a good thing? *N.Eng J Med.*, 2003;348: 167-9.
- 111.- Ganz T, Lehrer RI : Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 1999;5: 292-7.
- 112.-Levy O : Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood*, 2000;96: 2664-72.
- 113.- Zasloff M. : Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002 ;415: 389-95.
- 114.-Zudaire E, Portal-Núñez S, Cuttita F.: The central role of adrenomedullin in host defense. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006;80: 237-44.
- 115.- Matsuzaki K.: Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999;1462: 1-10.
- 116.-Shai Y.: Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.*Biochimica et Biophysica Acta*, 1999; 1462: 55-70.
- 117.-Yang L, Weiss TM, Lehrer R, Huang HW.: Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical Journal*, 2000;79: 2002-9.
- 118.- Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET.: Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2006; 46: 123-49.
- 119.-Serhan CN.: Resolution phase of inflammation: Novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology* , 2007;25: 101-37.
- 120.- Brash AR. : Lipoxygenases: occurrence, functions,catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 1999;274: 23679-82.
- 121.-McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott S.: Biologically active oxidized phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 1999;274: 25189-92.
- 122.-Seeds MC, Bass DA. : Regulation and metabolism of arachidonic acid. *Clin Rev Allergy and Immunology*, 1999;17: 5-26.
- 123.-Campbell WB.: New role for epoxyeicosatrienoic acids as antiinflammatory mediators. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2000;21: 125-7.
- 124.-Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. : Cyclopentanone prostaglandins: new allies in the war on inflammation. *Nature Medicine*, 2000;6: 137-8.
- 125.-Brash A.:Arachidonic acid as bioactive molecule.. *Clin Invest*, 2001;;107:1339-45.
- 126.-Fitzpatrick F:Regulated formation of eicosanoid. *J.Clin Invest*,2001;;107:1347-51.
- 127.-Funk C.: Prostaglandins and leukotrienes: advances in ecosanoid biology.*Science* , 2001; 294: 1871-5.
- 128.- Serhan CN, Oliw E.: Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest*, 2001,107: 1481-89.
- 129.-Riedemann NC, Ward PA.: Oxidized lipid protects against sepsis.*NatureMedicine*, 2002; 8: 1084-5.
- 130.-Serhan CN. : Resolution phase of inflammation: novel endoge-nous anti-inflammatory lipid mediators and pathways.*Ann Rev of Immunol*, 2007 ;25: 1001-37.

- 131.- Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS.: Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J of Biol Chemistry*, 1999; 274: 22903-6.
- 132.-FitzGerald GA, Loll P.: Series introduction: COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandins research [Perspective series: Prostaglandins and their precursors (G. A. FitzGerald, Series ed.)]. *J Clin Invest*, 2001; 107: 1335-7.
- 133.-Smith WL, Langenbach R.: Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*, 2001;107: 1491-5.
- 134.-Soberman RJ, Christmas P.: The organization and consequences of eicosanoid signalling. *J Clin Invest*, 2003;111: 1107-12.
- 135.- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R.: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, 2002; 23: 144-50.
- 136.-Pockley AG. : Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* , 2003;362: 469-76.
- 137.- Cronstein BN.: Adenosine and its receptors during inflammation. En: Charles N Sheran & Peter A Ward, eds. *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*.1999.Totowa, New Jersey: Humana Press; XII, pág 259-74.
- 138.- Auernhammer CJ, Melmed S.: The central role of SOCS-3 in integrating the neuroimmunoendocrine interface. *J. Clin Invest*,2001;108: 1735-403.
- 139.- Kishimoto T.: Interleukin-6: From basic science to medicine – 40 years in immunology. *Ann Rev Immunol.*, 2005;23: 1-23.
- 140.- Rose-John S.: Interleukin-6 is coordinated by membrane bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J.Leucocyte Biol.*, 2006;80: 227-36.
- 141.- Tracey KJ : The inflammatory reflex. *Nature*, 2002; 420: 853-9.
- 142.- Molina PE.: Neurobiology of the stress response: contribution of the sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in traumatic injury. *Shock*, 2005; 24: 3-10.
- 143.- Libert C.: A nervous connection. *Nature*, 2003; 421: 328-9.
- 144.- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C.: Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*, 1984;311: 223-7.
- 145.- Anderson KV., : Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell*, 1985; 42: 791-8.
- 146.- Belvin MP, Anderson KV.: A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Ann Develop Biol.*, 2006; 12: 393-416.
- 147.- Hashimoto C., : The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 1988 ; 52: 269-79.
- 148.-Schneider DS, Anderson KV.: Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes and Development* ,1991;5: 797-807.
- 149.-Akira S, .: Toll-like receptor signalling. *Nature Rev Immunol*, 2004; 4: 499-511.
- 150.- Rock FL, Hardiman G, Timans JC.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Nat Acad Sciences USA*, 1998;95: 588-93.
- 151.- Di Noia JM, Neuberger MS.: Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Ann Rev of Biochemistry*, 2007;76: 1-22.
- 152.- Poltorak A, He XL, Smirnova I. : Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*,1998;282: 2085-8.
- 153.- Medzhitov R, Preston-Hurlburt Janeway CA.: A human homologue of the *Drosophila*



- Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997;388: 394-7.
- 154.- Barton GM.: A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 2008;118: 413-20.
- 155.- Medzhitov R, Janeway C.: Innate immunity. *New Engl J Med.*,2000;343: 338-44.
- 156.-Beutler B.: Toll-like receptors: how they work and what they do. *Current Opinion in Haematology*, 2002; 9: 2-10.
- 157.-Janeway CA, Medzhitov R.: Innate immune recognition. *Ann Rev of Immunol*, 2002 ;20: 197-216.
- 158.- Melmed S.:The immunoneuroendocrine interface.*J Clin Invest*, 2001,108:1563-6.
- 159.-Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM.: Neuroendocrine regulation of immunity. *Ann Rev of Immunol*, 2002; 20: 125-63.
- 160.- Arzt E.: gp130 cytokine signalling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *J Clin Invest*, 2001,108: 1729-33.
- 161.-Beutler B.: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 2004; 430: 257-63.
- 162.- Murphy TJ, Paterson HM.: Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *J Leukocyte Biol*, 2004; 75: 400-7.
- 163.- Yoshimura A, Mori H, Oishi M.: Regulation of TLR signalling and inflammation by SOCS family proteins. *J Leukocyte Biol*, 2004 ;75: 422-7.
- 164.- Kobayashi KS, Flavell RA. : Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *J Leukocyte Biol*, 2004;75: 428-33.
- 165.- Miggin SM, O'Neill LAJ. : New insights into the regulation of TLR signalling. *J. Leukocyte Biol*, 2006; 80: 220-6.
- 166.- Raetz CRH.,: Lipopolysaccharide endotoxins. *Ann Rev Biochem*, 71; 635-700.
- 167.- Rauchhaus M., : The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *The Lancet*, 2000,356: 930-3.
- 168.-West AP, Koblansky AA, Ghosh S.: Recognition and signalling by toll-like receptors. *Ann Rev of Cell and Development Biol*, 2006; 22:409-37.
- 169.- Gay NJ, Gangloff M.: Structure and function of toll receptors and their ligands. *Ann Rev Biochemistry*, 2007; 76: 141-65.
- 170.- Bauer S, Hartmann G.: In *Toll-like Receptors (TLRs)and Innate Immunity*. Berlin: Springer-Verlag, 2008.
- 171.- Lich JD, Ting JP-Y.: CATERPILLER (NLR) family members as positive and negative regulators of inflammatory responses. *Proc Am Thoracic Soc*, 2007; 4: 263-6.
- 172.- Chamaillard M, Girardin SE.: Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cellular Microbiology*, 2003; 5: 581-92.
- 173.- Tschopp J, Martinon F.: NALPS: A novel protein family involved in inflammation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003; 4: 95-104.
- 174.- Inohara N,Chamaillard M.: NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory diseases. *Ann Rev of Biochem*, 2005;74: 355-83.
- 175.- Strober W.: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature Review Immunology*, 2006 ;6: 9-20.
- 176.- Drenth JPH, van der Meer JWM.: The inflammasome – A linebacker of innate defense. *N Engl J Med*, 2006 ; 355: 730-2.
- 177.-Mariathasan S, Monack DM.: Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2007;7: 31-40.
- 178.-Martinon F, Tschopp J.: Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches

of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, 2007; 14: 10-22.

179.- Fink SL,.: Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 2005;73: 1907-16.

180.-Macfarlane M.: Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Reports*, 2004 ; 5: 674-8.

181.-Shintani T, : Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*,2004;306: 990-5.

182.- Martinon F.: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3inflammasome. *Nature*, 2004 ;440: 237-41.

183.- Ting JP, Kastner DL,Hoffman HM.: CATERPILLER, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature Rev Immunology*, 2006; 6: 183-95.

184.- Kawai T, .: Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*, 2006 ; 7: 131-7.

185.- Michel T, Feron O.: Nitric oxide synthases: nitric oxide and nitric oxide synthases. *J Clin Invest.*, 1997; 100: 2146-52.

186.-Nathan C.: Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. *J Clin Invest* , 1997; 131.- 2417-23.

187.-Colasanti M, Suzuki H.: The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Science*, 2000 ; 21: 249-51.

188.-Saul P.W.: Regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Ann Rev of Physiology*, 2002 ; 64: 749-74.

189.- Rittirsch D, Hoesel LM, & Ward PA.: The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukocyte Biol*, 2006; 81: 137-43.

190.- Hotchkiss RS, Karl IE.: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003 ; 348: 138-50.

191.- Moine P.: Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock*, 2004; 22: 297-308.

192.- McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM.: Toxic shock syndrome and bacterial superantigens:an update. *Ann Rev of Microbiol* 2001; 55: 77-104.

193.- Rhen T, Cidlowski JA.: Antiinflammatory action of glucocorticoides – New mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* ,2005;353:1711/23.

+++++\*\*\*\*\*+++++

## RELEASE OF IL-4 FROM ATOPIC AND NON-ATOPIC LYMPHOCYTES STIMULATED BY A BAT ALLERGEN

Angel Alonso, Santiago R. Rodriguez, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico.  
Cátedra de Microbiología- Fac.de Medicina- UBA ; Div. Alergia-e Inmunología. Hosp de  
Clínicas UBA . SCA. ANCBA

Resumen : se exponen los hallazgos obtenidos luego de incubar linfocitos de sujetos atópicos y no-atópicos con un extracto de heces de murciélago (murcielaquina) y el pico proteico de las mismas obtenido por una columna de Sephadex G-150. Los valores de la IL-4 fueron superiores en los cultivos de los linfocitos de sujetos atópicos lo que se presume vinculado con la producción de rinitis/asma en los sujetos atópicos.

Palabras clave : muricielaquina; IL-4 ; atopía; rinitis/asma; pico proteico; Sephadex G-150.

Summary : the release of IL-4 was measured in lymphocytes cultures with bat feces and its protein peak obtained by a Sephadex G-150 column. The IL-4 was high in those cultures coming from atopic patients (rhinitis/asthma) and it explains their hypersensitivity to bat antigens.

Key words : IL-4 ; bat feces ; protein-peak; atopy; rhinitis/asthma; Sephadex G-150.

### INTRODUCTION and BACKGROUND.

In a previous paper it was demonstrated that a pigeon feces extract was able to cause respiratory symptoms in animals and in humans belonging to hypersensitivity types I, III and IV. In big cities, tall buildings with rolling shutters on their windows serve as refuges for bats, especially on the highest floors. Bat feces and urine then contaminate the frames and hinges of the windows, dry out and pollute the indoor environment. The bat feces were collected from outside the windows on the highest floors of tall buildings in Buenos Aires and from the inside rolling shutters. The feces appeared in small dry black grains, like rice, and had unpleasant odor ; each particle was collected with nippers and kept in a sterile reservoir. This material was processed following the Frugoni-Hansen method. The extract thus obtained was subjected to the Bradford method for the quantitative measurement of proteins while the carbohydrate content was determined by the indol method using a mixture of galactose and mannose as standard solutions in the Metrolab spectrophotometer at 470 nm optical density (OD). (1-2-3-4-5-6-7-8).

On the other hand, adult albino rabbits were immunized against the whole bat feces extract. Weekly intradermal injections of an emulsion of 0,5 mL bat feces plus 0,5 mL complete Freund's adjuvant were administered during 12 weeks. The injections were adequately distributed in wheals of 0,20 mL each after gentle shaving of the hairy dorsum. Ten days after the last injection they were bled to death and the sera obtained were stored at -20° C. These antisera were checked against the bat extract with the Ouchterlony technique as well as immunoelectrophoresis and the passive hemagglutination test (Boyden) to evaluate its antigenicity in animals and the properties of the antibodies obtained. Other antigens such as bat epithelium, rat serum, rat epithelium and pigeon feces were used in order to check cross-reactivities among them.

The undiluted bat extract was subjected to gel filtration by a Sephadex G-150 column of 22 x 780 mm and elution was done with 0,15 M ClNa buffered with phosphate at pH 8

and 4° C. Only one protein peak (tubes 42-57) was obtained and also three peaks with high sugar content (tubes 13, 36 and 48). The Bradford method revealed the following contents : bat feces extract 20 mg/mL and Sephadex G-150, tubes 42-57, 15 mg/mL. The indol method revealed the following sugar contents: bat feces extract 50 mg%, Sephadex G-150, tube 13 : 8 mg%, tube 36 : 9 mg% and tube 48 : 26 mg%. The Ouchterlony revealed one precipitin line between the rabbit antiserum and the bat extract. Negative results appeared against the other antigens. The Boyden technique showed a positive titer of 1/512 when the anti-bat serum was checked against the bat extract and 1/64 against the tubes 42-57. (9-10-11-12-13-14-15).

The SDS-PAGE and immunoblotting were performed with the use of an 11% polyacrylamide gel as described by Laemmli. After electrophoresis proteins were blotted by passive transfer to 0,2 µm pore-size nitrocellulose membranes. The strips were then washed twice with PBS-Tween for 10 min each and incubated for 2 hs with a mouse antirabbit-IgG antibody (1/3000 in PBS). After washing the strips were incubated in biotinylated rabbit anti-mouse antiserum (1/5000), washed and finally incubated in a streptavidin-peroxidase (1/10.000) for 30 min.

After overnight washing the strips were developed by using a chemiluminescence system. The bat feces extract and its fraction were filtered through a Millipore 0,22 µ to assume sterility. Each atopic and non-atopic patient received intracutaneously injections in the arm of 0,025 mL of bat feces and the protein peak. Saline pH 7,2 and histamine 1/1000 were used as controls. Skin tests were read at 15 min according to the scale : 1+ : 1-4 mm ; 2+ : 5-9 mm; 3+ : 10-14 mm and 4+ : more than 15 mm. None of the patients were taking antihistamines, steroids and immunosuppressive drugs. The RAST to detect specific anti-bat IgE was carried out following Ceska's technique. RAST-inhibition was carried out following Gleich methodology. In the atopic group the bat feces extract and its protein fraction revealed a 29,78% and a 21,27% positivity, respectively, with an acceptable correlation with the RAST-IgE-anti-bat feces of the same sera in 83,94% of them. The RAST-inhibition confirmed the specificity of the positive RAST reactions. Total inhibition was observed with bat feces in the positive anti-bat feces sera while no inhibition was detected with ragweed, grass pollens and cat dander.

SDS-PAGE showed at least 13 different protein bands between 29 kDa and 116 kDa. Only those between 45 kDa and 66 kDa blotted the immune serum when the strips were incubated with the anti-IgG-serum.

To study the enzymatic and proteolytic activities of the bat extract minigels of 10x10 cm each and 1,5 mm thick composed of 12% acrylamide were made with gelatin at a final concentration of 0,2%. They were run at 130 V for 2 hs. The washing and incubation of the gels were done with and without the protease inhibitors. The solutions employed were E64 (L-trans-epoxy-succinylleucyl amido (4-guanidino)-butane 20 µM; tosyl-lysyl-chloro-methyl-ketone (TLCK) 100 µM; tosyl-phenyl-alanyl-chloro-methyl-ketone (TPCK) 1 mM; phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride (PMSF) 10 mM; leupeptin 100 µM ; o-phenantroline 1 mM and pepstatin-A 2 µM. (16-17-18-19-20).

Bat in SDS-PAGE showed 6 to 8 bands between 21 to 97 kDa. The gelatinolytic activity of the bat in SDS-PAGE with copolymerized gelatin as substrate was recorded. The proteolytic activity pattern of bat was analyzed at three pH levels : 3,5 ; 6 and 8,5. The highest enzyme activity was at pH 8,5 with less activity at pH 6 and no activity at pH 3,5. Total activity pattern at pH 8,5 was highly sensitive to TLCK and PMSF. The major and

broad band (65 kDa) and the minor (31 kDa) showed the same inhibition pattern. Hence a trypsin-like serine protease was tentatively characterized. Meanwhile all the proteins separated by SDS-PAGE showed immunoreactivity in the Western-blot with a polyclonal rabbit anti-bat serum only 2 bands (21 and 40 kDa) reacted with the human atopic sera suggesting correlation between allergenicity and gelatinolytic protease activity.

#### **MATERIALS and METHODS.**

1.- **Patients** : we selected 30 adult persons suffering an atopic disease (rhinitis/asthma, polinosis, vernal rhinoconjunctivitis) with a strong familial history of atopy and with high serum IgE levels ( $210 \pm 74$  KU/L). They also showed highly positive skin tests performed with several allergens such as mites, cockroaches, moulds and pollens. They were 20 women and 10 men aged between 22 and 78 years with good health and only submitted to antihistamines and  $\beta_2$  agonists aerosols ad libitum. On the other hand, we choose another 20 persons, 10 women and 10 men aged 25 to 75 years old, in good health that did not suffer any atopic condition and did not have familial background of atopy. They were the control group of the experiment and revealed only  $18 \pm 15$  KU/L of serum IgE. They were not using antihistamines, steroids or immunosuppressive drugs at the time of the vein puncture to obtain the blood. All of them signed the informed consent.

2.- **Lymphocytes culture** : ten milliliters of blood were obtained from the vein of the elbow of each person and they were submitted to Boyum's technique to separate blood lymphocytes in a Ficoll-Hypaque gradient (density  $1,077 \text{ g/cm}^3$ ) and then kept in a culture medium as RPMI 1640 (Gibco). The cells were separated by each donor so we have 50 different wells to incubate the cell suspension with the bat antigen and with the protein peak obtained by Sephadex G-150 (tubes 42-57) and to measure after 24 hours the quantity of IL-4 release in the well by the cell. The measurement of IL-4 was carried out using a mouse anti-human IL-4 (Sigma Chemical Co., clone n° 34019.111) by ELISA. A system PAP-anti-PAP was used as a enzymatic indicator to read the result. Lymphocytes from atopic and non-atopic patients were submitted to the same methodology.

3.- **Statistical analysis** : differences were considered to be statistically significant at p values  $< 0,05$ .

#### **RESULTS.**

They are summarized in Tables I and II.

**TABLE I**  
**VALUES OF ATOPIC LYMPHOCYTIC IL-4 IN CELL CULTURE (UI/mL).**

Ages	Incubated with bat allergen	Incubated with the protein
extract (13 mg/mL)	tubes 42-57	(13 mg/mL)
20-29	140	70
30-39	96	65
40-49	169	74
50-59	189	90
60-69	110	64
70-79	88	62
	X: 132	X: 70,83
	DE ± 40,98	DE ± 11,10

**TABLE II.**  
**VALUES OF NON-ATOPIC LYMPHOCITYC IL-4 IN CELL CULTURE. (UI/mL).**

Ages	Incubated with bat allergen	Incubated with protein peak
extract (13 mg/mL)	(tubes 42-57)	(13 mg/mL)
20-29	6	3
30-39	4	5
40-49	2	4
50-59	14	7
60-69	18	12
70-79	9	1
	X: 8,83	X: 5,33
	DE ± 3,13	DE ± 1,84

**DISCUSSION.**

When we compare the results obtained with the whole bat allergen extract and its protein peak we realize that the values of IL-4 in the cell culture of human lymphocytes coming from atopic versus non-atopic patients are very near to a significant  $p < 0,001$  considering that spontaneously the atopic or non-atopic lymphocytes did not release IL-4 without stimulation.

It is possible that the reactivity strictly atopic of the lymphocytes coming from patients suffering rhinitis and bronchial asthma could be attributed to other physicochemical factors like proteases of the serine or trypsin types. These products could amplify the response and also explain the IL-4 released by the non-atopic lymphocytes as it was observed in the control group.

It was also interesting that in the atopic group the ages between 40 and 60 years old were

the most significant in the amount of cytokine released. Perhaps a chronic mucous contact with the antigen is the main responsible of this finding.

On the other hand, we realize that the number of the patients involved in this study is very low and perhaps a greater number of atopic and non-atopic patients are necessary to sustain or modify these conclusions specially if we take into account that the atopic population is near to the 18-20% of the general population and that not everyone lives in apartments of tall buildings or very old houses occupied by bats colonies.

#### **REFERENCES.**

- 1.- Spiewak R., Johansson S., Wütrich B.: Berufbedingtes asthma auf fledermaüse. *Allergologie*, 1996; 19 (11) : 509-511.
- 2.- Alonso A., Irañeta S.G., Rodríguez S.M., Scavini L.M.: Bat feces as an indoor allergen. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1998; 8 : 365-369.
- 3.- Alonso A., Mouchián K., Albónico J.F., Pionetti C.H., Potenza M., Bignone M.L.: Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos por los antígenos de las heces del murciélago. *Allergol et Immunopathol.*, 2003 ; 31 : 215-220.
- 4.- Barret A.J. : Classification of peptidases. *Meth Enzymol.*, 1994; 244 : 1-15.
- 5.- Cazzullo J.J. : Some kinetic properties of a cysteine-proteinase from *Trypanosoma cruzi* . *Biochem Biophys Acta*, 1990; 1037 : 186-191.
- 6.- Frugoni C. : Preparación de extractos alérgicos. In : *Alergia Clínica*. Hansen K., Werner M., (Eds), Salvat, Barcelona, 1970, pág. 586.
- 7.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Anal Biochem.*, 1976 ; 72 : 248-254.
- 8.- Laemmli U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970 ; 227 : 680-686.
- 9.- Henssen C. : Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.*, 1980 ; 102 : 196-202.
- 10.- Panneerselvam M. : Chromatographic purification and homogeneity of extracellular acid proteinases of *Aspergillus fumigatus*. *Ital J Biochem.*, 1980 ; 29 : 102-112.
- 11.- Towbin H., Staehlin T. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979 ; 76 : 4350-4354.
- 12.- King C., Simpson R.: The isolation and characterization of a novel collagenolytic serim protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol.*, 1996 ; 98 : 739-747.
- 13.- Irañeta S.G., Duschak V., Rodríguez S.M., Seoane M.A., Albónico J.F., Alonso A. : Proteinase and gelatinolytic activities of house-dust mite and cockroach extracts. *J. Invest Allergol Clin Immunol.*, 1999; 9 : 235-240.
- 14.- Alonso A., Pionetti C.H., Scavini L.M., Mouchián K. Immunochemical properties of the antigens involved in the pigeon breeder's disease. *Allergol et Immunopathol.*, 1988; XVI : 347-352.
- 15.- Dische A. : The indol method. En: Glick D. eds. *Methods of Biochemical Analysis*. New York. Academic Press. 1958 ; 2 : 200-210.
- 16.- Crowle A.: Precipitin antibodies. En : *Immunodiffusion*. New York. Academic Press. 1961 ; 46-67.



- 17.- Ouchterlony O. : Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 1958 ; 5 : 1-9.
- 18.- Boyden S.V. : The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exp Med.*, 1951 ; 93 : 107-112.
- 19.- Ceska M. : Radioallergosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin Immunol.*, 1972; 49 : 1-10.
- 20.- Gleich G.J. : Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST. *J Allergy Clin Immunol.*, 1974; 158 : 113-119.

## UTILIDAD DE LOS PEPTIDOS 33 Y 38 DEL POLEN DE LA GRAMINEA LOLIUM PERENNE EN LA INMUNOTERAPIA DE LA POLINOSIS

Krikor Mouchián, Angel Alonso. -

Div. Alergia e Inmunología. Htal de Clínicas. UBA. SCA. ANCBA

La polinosis o rinoconjuntivitis estacional, con o sin asma, es un paradigma de enfermedad alérgica-atópica. Su tratamiento con inmunoterapia iniciado exitosamente en 1911 modificó totalmente su evolución clínica. Entonces se utilizaron extractos polínicos crudos por lo cual en atención a lo establecido por la OMS en 1998, se desarrolló un estudio en 30 pacientes atópicos (IgE sérica total  $\geq 120$  KU/L) durante 3 años inoculando 2 péptidos extraídos y purificados del polen por medio del fraccionamiento por columnas de Sephadex G-50, de DEAE-celulosa, SDS-PAGE, electroforesis mono y bidimensional e inmunotransferencia. Como control se utilizó un grupo de 25 sujetos no atópicos (IgE sérica total  $\leq 50$  KU/L). Los grupos fueron testificados con el polen total, los péptidos y las hexosas obtenidos, pero el grupo experimental, que mostró reactividad cutánea a los mismos, se dividió en 3 grupos recibiendo el **A** sólo pólen total, el **B** el péptido 33 y el **C** el 38, por vía subcutánea, semanalmente, desde 6  $\mu$ g hasta 100  $\mu$ g de cada uno. Se midieron las IgE e IgG mono-específicas (RAST) en cada caso, hallando al cabo de los 3 años, que las IgE-RAST-anti-polen, anti-33 y anti-38 descendieron con una  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  y  $p \leq 0,05$ , respectivamente, mientras que las IgG-RAST-anti-polen, anti-33 y anti-38 subieron con una  $p=0,10$ ,  $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,05$ , respectivamente. **Se destaca la inmunogenicidad de los péptidos empleados por encima del extracto total no purificado.**

+++++\*\*\*\*\*+++++

## Utilidad del VIC en la valoración de la funcionalidad de los linfocitos T

Angel Alonso, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico, Carlos H. Pionetti,  
Div. Alergia e Inmunología – Hosp. de Clínicas – Cátedra de Microbiología – Fac. Medicina  
– UBA. SCA. ANCBA. –

### Introducción.

En 1992, publicamos un método para la valoración de las pruebas cutáneas de lectura tardía (VIC : valoración de la inmunidad celular) con antígenos bacterianos, micóticos y virales, como estrategia sencilla y de reconocida idoneidad para valorar la competencia de la respuesta inmune celular en general, y, de la subpoblación linfocitaria T portadora del marcador CD4 en especial. Existían equipos munidos de antígenos estandarizados que, con una aplicación sencilla favorecían la evaluación uniforme de los resultados mejorando la metodología en nuestro medio, pero ahora deben ser importados, y ello limita su utilización de rutina. (1 a 15).

Por ello, confeccionamos un grupo de antígenos inductores de las reacciones inflamatorias de hipersensibilidad retardada (tipo IV de Gell & Coombs), de aplicación intracutánea sencilla y de lectura a las 48 horas (de acuerdo con la OMS), cuyo resultado lo correlacionamos con el nivel sanguíneo de los linfocitos totales y los LTCD4+ en particular. Este trabajo expone los datos obtenidos en los últimos 20 años de aplicación de esta metodología en el ambiente hospitalario, tanto en sanos como en portadores de diversas patologías. (16 a 21).

### Materiales y métodos.

Pacientes : se estudiaron 3 grupos diferentes constituidos por consultantes espontáneos o interconsultas de internados en el Hospital. Así, el **grupo A**, estuvo compuesto por 210 adultos, 130 varones y 80 mujeres, con edades comprendidas entre los 22 y 79 años, con buen estado general, cuya problemática no tenía que ver con las enfermedades de los otros 2 grupos ni involucraban al sistema inmunológico, y, que se avinieron a integrar el grupo control de la experiencia luego de las explicaciones éticas y formales del estudio a realizar. Setenta y cuatro de estos pacientes provenían de la Cátedra de Traumatología y Ortopedia (gentileza Prof. Tit. Arturo Otaño Sahores) por haber rechazado la prótesis de cadera operada y que debían ser reoperados presentando un buen estado general. El resto había padecido reacciones idiosincráticas ante la ingestión de fármacos antiinflamatorios y de anestésicos locales y no eran portadores de una patología inmunológica o que comprometiese a dicho sistema.

El **grupo B**, estuvo constituido por 135 portadores del HIV en diferentes estadios de su enfermedad (2 y 3 del CDC), antes y después del tratamiento antiretroviral, derivados de las salas de Medicina Interna, de la División Infectología y del Programa de Enfermedades de Transmisión Sexual (PETS) del Hospital. Se dividían en 118 varones y 17 mujeres cuyas edades estaban comprendidas entre los 25 y 45 años.

El **grupo C**, se compuso por 99 pacientes no-HIV sino portadores de diversas patologías oncológicas, infecciones respiratorias crónicas (EPOC y recidiva de TBC) y sujetos de la tercera edad que, sin diagnóstico preciso eran sometidos al VIC, para completar una valoración general de su estado de salud. Fueron 74 varones y 25 mujeres cuyas edades estaban comprendidas entre los 59 y 77 años.

Antígenos : 1): Candida albicans en una dilución 1/10 del concentrado inicial que contenía

100.000 levaduras/mL; 2): una mezcla en partes iguales de extractos concentrados de *Tricophyton mentagrophytes* y *rubrum* de 10.000 elementos/mL diluida 1/10; 3): la PPD del Instituto Malbrán de Buenos Aires en una dosis de 2 UT; 4): un pool de *Estreptococos* integrado por las variedades *viridans* y *faecalis* a razón de 50.000 gérmenes /mL de cada uno y utilizando una dilución 1/10 de la mezcla final; 5): un pool de *Estafilococos* constituido por las variedades *aureus* y *epidermidis* a razón de 50.000 gérmenes/mL de cada uno usado en una dilución 1/10 de la mezcla final ; 6): una suspensión 1/10 de un extracto de *Escherichia coli* conteniendo 50.000 gérmenes/mL ; 7): toxoide tetánico en una dilución 1/10 del contenido original y 8): fitohemaglutinina-M de Difco (Detroit, EEUU) reconstituída en 5 mL de PBS y diluida 1/10. Todas estas suspensiones fueron esterilizadas a través de filtros Millipore de 0,22  $\mu$ .

Todos ellos fueron inyectados por la vía intradérmica en la cara externa de la piel del brazo con 0,10 mL de cada suspensión descripta, por medio de una jeringa de tuberculina de 1 mL y una aguja de 13 x 0,4 mm, ambas descartables. A las 48 horas, se midieron los resultados y se conformó una fracción con 2 valores; el numerador de la misma que correspondió a un puntaje indicativo del **tamaño** de las reacciones nodulares, que se logró en función del diámetro de acuerdo con la siguiente convención : de 0 a 4 mm : puntaje 0 ; de 5 a 14 mm : puntaje 1; de 15 a 24 mm : puntaje 2 y más de 25 mm : puntaje 3. La sumatoria de los puntajes parciales de la respuesta a cada antígeno dio como resultado el puntaje final a ubicar en el numerador de la fracción. Sólo se consideraron como positivas a aquellas reacciones cuyos nódulos superasen los 5 mm de diámetro. El denominador de la fracción correspondió al número de pruebas positivas sobre el total de los 8 antígenos probados.

El ejemplo siguiente podría aclarar este sistema de valoración : candidina : 18 mm = 2 ; tricofitina : 0 mm = 0; PPD : 0 mm = 0 ; pool de estreptococos : 0 mm = 0; pool de estafilococos : 6 mm = 1 ; colibacilo : 4 mm = 0; tetanol : 0 mm = 0 y PHA-M : 0 mm = 0. Puntaje final : 3. Fracción : 3/2.

El método estadístico para la significación de las diferencias entre los valores obtenidos fue realizado por medio de la t de Student y del análisis de la varianza. Los niveles de  $p \leq$  de 0,01 se consideraron significativos mientras que la región entre una  $p = 0,01$  y  $p = 0,05$ , se definieron como una zona límite de significación a partir de la cual las conclusiones logradas deben formularse con reserva.

Los linfocitos totales se obtuvieron del hemograma convencional mientras que los LTCD4+ fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 y luego una IgG-anti-ratón marcado con fluoresceína. Se contaron por lo menos 200 células mononucleares.

### Resultados.

El **grupo A**, de pacientes sanos, reveló un puntaje promedio general de  $4,687 \pm 1,886$  pruebas positivas. Haciendo una distinción entre 2 subgrupos etarios se valoró que entre los 22 y 45 años ese valor fue de  $4,244 \pm 1,539$  mientras que en el subgrupo de 46 a 79 años fue de  $5,257 \pm 2,146$  pruebas positivas. Las variaciones entre los puntajes (4,244 y 5,257) expuso una significación estadística de  $p = 0,001$ , así como, también para el número de pruebas positivas (4,044 y 4,575) una  $p = 0,05$ . No se registraron variaciones estadísticamente significativas entre ambos sexos ni en el puntaje ni en el número de antígenos positivos. Por su parte, la reactividad a los antígenos empleados mostró que la candidina fue siempre la más positiva, entre el 88 y 97 % de los casos, tanto en hombres como en mujeres, predominando en el subgrupo de 22 a 45 años, mientras que el subgrupo

de 46 a 79 años, mostró reactividad a otros antígenos, en especial, de origen bacteriano (estrepto y estafilococos y PPD). La cuenta de los LTCD4+ exhibió valores entre  $1409 \pm 287$  con una  $p = 0,003$  para esta población en comparación con los otros 2 grupos.

El **grupo B**, por su parte, mostró que las pruebas con “antígenos de memoria” (recall antigens) daban un puntaje menor, entre  $2,02 \pm 0,80$  con un recuento de LTCD4+ de  $392 \pm 83$ , siendo la candidina el único antígeno que se mantenía reactivo en los pacientes en los cuales la mayoría se negativizaban.

El **grupo C**, exhibió un puntaje ligeramente superior al grupo anterior con  $2,38 \pm 1,15$  pruebas positivas y un recuento de LTCD4+ de  $720 \pm 154$ , destacándose la candidina y los antígenos bacterianos (estafilococos, estreptococos y colibacilos) como los más reactivos.

### Discusión.

Es ampliamente reconocida la utilidad de las pruebas cutáneas de lectura tardía (48 hs) en la valoración de la competencia inmunológica del sector LT dependiente (hipersensibilidad retardada del tipo IV de Gell & Coombs). En un principio, el uso de aplicadores descartables cargados con antígenos de referencia representó un avance indiscutible para este tipo de metodología. Ulteriormente, las dificultades inherentes a la obtención y al costo de estos adminículos nos motivó a desarrollar un sistema alternativo más acorde con las posibilidades de nuestro medio. Los antígenos fueron seleccionados de acuerdo con su capacidad de estimular a los LT de memoria con especificidad a nivel de su receptor. Se trata de antígenos micóticos y productos bacterianos pertenecientes a la flora normal y a las vacunas que, de acuerdo con el calendario respectivo, se administran durante el período escolar. La fitohemaglutinina se utilizó como estimulante inespecífico de la respuesta LT-dependiente (“blastogénesis in vivo”). Otros posibles antígenos como el virus de la parotiditis y el DNCB (dinitroclorobenceno) no fueron seleccionados por dificultades en obtener el primero en forma inactiva, y, por prudencia en el uso del segundo por su potencial efecto adverso.

El método de valoración que se adoptó informa sobre la magnitud de las reacciones registradas y el número de antígenos ante los cuales hubo respuesta. La forma de expresar tales valores como una fracción es puramente convencional, y, permite una rápida y fácil interpretación de los mismos, en especial, desde el punto de vista comparativo. Otra manera de valoración del puntaje (numerador de la fracción) basados en la sumatoria directa de los diámetros de los nódulos positivos conducen a cifras abultadas que entorpecen la consideración final. Además, al no considerar el número de reacciones positivas se resiente la exactitud del método. (Kniker M., Anderson G.T. : Ann. Allergy, 1984; 52 : 75-82).

El grupo control reveló un valor de  $4,687 \pm 1,886$ , o sea que, con 4 reacciones que midan 5 a 14 mm (4/4) como con sólo 2 positivas, pero con diámetros superiores a los 15 mm (4/2) demostrarían una respuesta adecuada. Sin embargo, la mayoría de los individuos sanos mostraron una distribución uniforme de los puntajes, y, al aumentar éstos aumentó también el número de pruebas positivas (denominador de la fracción).

De hecho, el 72,5 % de la población sana reaccionó a 4 o más antígenos de memoria con una distribución gaussiana. Los mayores de 46 años revelaron un valor mayor ( $5,257 \pm 2,146$ ) que es coincidente con otros autores (Kniker M. y col., Ibidem, 1984), pero se contrapone con otros investigadores que señalan una pérdida de la respuesta celular en la edad proveccta “in vivo” (Bonfort R.J., Topilsky L.E.: J. Pediatr., 1972; 81 : 775-780 y Sohnle P.G., Larson S.E. : J. Immunol., 1980; 124 : 2169-2174) e “in vitro”(Roberts-Thompson I.C. : Lancet, 1974

; 7877 : 368 y Grossman J., Baum J. : J.Allergy, 1975 ; 55 : 268-274).

Por ello, es que se enfatiza que la determinación del VIC puede ser más útil si se practica de manera **secuenciada** con un criterio **dinámico** cada 3 ó 6 meses, para así captar tendencias crecientes o decrecientes, y, no dejarnos llevar por una determinación aislada, en especial, en aquellos pacientes que están recibiendo algún tratamiento farmacológico.

La diferencia entre el **grupo A** y los **grupos B y C** es estadísticamente significativa ( $p \leq 0,0001$  y  $p \leq 0,001$ ), tanto en la respuesta a los antígenos de memoria, como en el número de LTCD4+ circulantes. El análisis de los 464 pacientes estudiados sostiene esta diferencia y enfatiza la utilidad del método, que, no pretende competir con la exactitud de la citometría de flujo, pero que, en lugares con difícil acceso a la alta tecnología, posibilita una información complementaria útil, como se ha demostrado con estos resultados.

El antígeno más reactivo fue la candidina que respondió en el 97 % de los sujetos del **grupo A** de 22 a 45 años, y, en el 88 % de aquellos de más de 46 años independientemente de que fueran hombres o mujeres. Similar hallazgo se detectó en los **grupos B y C**.

Varios autores puntualizaron la importancia de la estreptoquinasa (antígeno purificado) como sustancia de referencia (Youkeles L.H. : J. Allergy Clin. Immunol., 1980 ; 8 : 267-274); si bien nuestra valoración no la incluye, la incidencia de reactividad detectada para los estreptococos (antígeno más crudo) fue del 38 % contra un 70 % de otras series (Kniker M., Anderson G.T. : Ann. Allergy, 1984 ; 52 : 75-82 ). Debe recordarse que la aspergilina se emplea como antígeno de memoria, tanto en pruebas de lectura inmediata (IgE dependientes) como tardías, para valorar el estado inmunológico de los pacientes que sufren una ABPA (aspergilosis broncopulmonar alérgica), al igual que, con otras micosis profundas sistémicas (histoplasmosis, coccidioidomicosis, etc).

#### **Bibliografía.**

- 1.- Varela M.R., Asayag E., Alonso A. : Nuevo método para la valoración de las pruebas cutáneas de lectura tardía. Parámetros de referencia en una población sana. Semana médica, 1992 ; 5533 : 231-238.
- 2.- Bradley J.A., Hamilton D. : Assessment of host resistance in critically ill surgical patients by the response to recall skin antigens. Intensive Care Med., 1981 ; 7 : 105-108.
- 3.- Champault G., Boutelier P.H. : Evaluation de l'état immunitaire en milieu chirurgical. Comparison de deux methods : multipuncture et intradermo-reaction. Méd. Chir. dig., 1981; 10 (1), 15-22.
- 4.- George C., Sabatier C. : Tests cutanés explorant l'immunité cellulaire chez les maladies en reanimation. Relation entre les résultats et la mortalité. Nouv.Presse Med., 1978; 7 (29), 2541-2544.
- 5.- Miller C.L. : Immunological assays as measurements of nutritional status : a review. JPEN, 1978 ; 2 (4), 554-566.
- 6.- Twomey P., Rombeau J. : Utility of skin testing in nutritional assessment : a critical review. JPEN, 1982 ; 6 (1) : 50-58.
- 7.- Anaya F., Valderrabano F. : Estudio de la hipersensibilidad cutánea retardada en pacientes en hemodiálisis. Nefrología, 1982 ; 2 (28,29,30), supl. I; 43-44.
- 8.- Amery W.K. : Cancer immunotherapy : some critical comments regarding immunological monitoring. Int. J. Immunopharmacol., 1981; 3 (4) : 339-348.
- 9.- Betzler M., Herfarth C. : Delayed cutaneous hypersensitivity reactions in cancer patients by multitest. Deutscher Chirurg. Kongress, München, 22-25 april 1981.
- 10.- Delbrück H.G., Kopper B. : Immunomonitoring mit recall-antigenen bei patienten mit

- disseminierten malignem Hodenteratom. Beiträgen zur Onkologie, 1981; 8 : 271-276.
- 11.- Delbrück H.G., Jäger H. : Cutaneous tests with recall antigens in tumor patients and healthy subjects. Experiences with a new multitest system. Tumordiagnostik, 1982 ; 3 (1) :18-24.
  - 12.- Morris D., Marshall M. : Recall antigen delayed type hypersensitivity skin testing in melanoma and acute leukemia patients and their associates. Cancer Res., 1979 ; 39 : 219-226.
  - 13.- Goutner A., Mathe G. : L'exploration immunitaire du patient cancéreux : cellules suppressives et cellules NK. C.R.Soc.Biol. (Paris), 1980 ; 174 (4) : 750-755.
  - 14.- Lang J., Girón C. : Hypersensibilité retardée cutanée dans la maladie de Hodgkin. Etude quantitative par un nouveau système standardisé de multipuncture. Presse Med., 1983 ; 12 (11) : 699-705.
  - 15.- Pinching A., Harris J. : Studies of cellular immunity in male homosexuals in London. Lancet, 1983 ; 2 (8343) : 126-129.
  - 16.- Alonso A., Coduri M.L., Bignone M.L., Pionetti C.H. : Comparison among delayed-type skin tests, serum IgE levels and peripheral blood CD4 in HIV-positive patients. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1997; 7 (3) : 183-185.
  - 17.- Kniker W.T. : The Multi-test system : a standardized approach to evaluation of delayed hypersensitivity and cell-mediated immunity. Ann. Allergy, 1979; 43 : 73-78.
  - 18.- Yonkeles L.H., Soliman M.Y. : Use of streptokinase as a recall antigen for lymphocyte proliferation testing in vitro. J. Allergy Clin. Immunol., 1991 ; 88 : 166-169.
  - 19.- Heisser A., De Guzmán R. : Delayed-type hypersensitivity skin testing for the evaluation of cellular immunity : normal responses for adult men and women. J. Allergy Clin. Immunol., 1996 ; 97 : 399 (Abstr.)
  - 20.- Casseb J., Benard G. : The value of the lymphocyte proliferation test with PHA in the immune evaluation of Brazilian HIV-infected patients. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1995; 5 : 347-349.
  - 21.- Mosmann T.R. : Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immunol., 1989 ; 7 : 145-149.

### **Summary.**

Data concerning the usefulness of delayed-type hypersensitivity skin tests with recall antigens are exposed. This easy technique has enormous value in the follow-up of the LT dependent immune competence frequently involved in several chronic diseases. We studied 464 patients with ages between 22 and 79 years old. Those 210 healthy controls revealed at least  $4,24 \pm 1,15$  positive skin tests with  $1409 \pm 287$  LTCD4+ cells meanwhile 135 HIV patients showed  $2,02 \pm 0,80$  positive tests with  $392 \pm 83$  LTCD4+ cells and 99 older subjects revealed  $2,38 \pm 1,15$  with  $720 \pm 154$  LTCD4+ cells. Statistical differences between the groups were recorded.



# INMUNO-BIOLOGÍA DEL TRIATOMA INFESTANS (VINCHUCA)

## INTRODUCCIÓN

Angel Alonso

Los Triatomíneos son reduvídeos que constituyen insectos hematófagos de gran importancia sanitaria. Son conocidos por las denominaciones vulgares de "vinchucas", "chupos", "chirimachas", "pitos", "chinchas aladas", "barbeiros", "conesone bugs" y "kissing bugs", según la zona de América del Sur, Central y del Norte en que se las encuentra. Comprenden a un centenar de especies, con hábitat silvestre y se hallan en los nidos de las aves, madrigueras, oquedades de los árboles y cúmulos de piedras.

Las más importantes son las que se han habituado a colonizar la vivienda humana. Algunas especies, como *Triatoma infestans*, se han transformado en estrictamente domiciliarias. Su morfología es la de las grandes chinchas vegetales, con forma alargada y abdomen ancho y aplastado. Su tamaño y coloración es variable según las especies.

La cabeza es alargada, cilíndrica o cónica, con una trompa picadora que emerge del extremo anterior. Posee ojos compuestos y grandes; antenas finas y largas; y el tórax es firme y muy queratinizado. De él nacen 2 pares de alas bien desarrolladas que cubren al segundo par de alas más membranosas. Hay especies ápteras como *Triatoma porteri*. El abdomen es ensanchado con un borde lateral que posibilita el diagnóstico diferencial entre las especies por sus manchas distintivas. Son insectos nocturnos que pican en la oscuridad mientras que sus víctimas están dormidas. Otras atacan a plena luz del sol como sucede con *Triatoma spinolai*. La picadura es indolora pues el insecto necesita llenar su abdomen sin intranquilizar al animal o a la persona atacada. Defecan durante el acto de la alimentación, lo que es importante en el mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas-Mazza.

Se alimentan vorazmente cuando tienen una víctima a su alcance aunque pueden ayunar durante largos períodos, lo que se comprueba en el laboratorio cuando no se dispone de sangre de paloma para su ingesta. Se desarrollan por metamorfosis gradual o incompleta pasando por 5 estadios ninfales, con un ciclo lento, de varios meses y que depende de la temperatura, humedad y alimentos ambientales. Las condiciones naturales óptimas se hallan entre los 15° y 33° C en zonas secas. Si bien existen especies fitófagas que no agreden a los mamíferos, las hematófagas, como *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sórdida*, *T. rubrovaria*, *T. eratyrusiforme* y *T. spinolai*, son vectores del *Tripanosoma cruzi*.

Corresponde recordar a la especie *Panstrongylus megistus*, que Carlos Chagas encontró parasitada en sus primeros estudios en Minas Gerais (Brasil) y a la especie *Rhodnius prolixus* localizada en Colombia y Venezuela y responsable de la infección humana en esos países. En el ámbito domiciliario, *T. Infestans* se comporta como un insecto lucífugo y nocturno, que abandona su refugio de las grietas, o detrás de cuadros y papeles, o dentro de los muebles o de las prendas o ropas que quedan colgadas en las paredes. Allí las hembras colocan entre 100 y 200 huevos con un ciclo que dura entre 8 y 9 meses; el insecto adulto vive 18 meses. Si bien las viviendas más infectadas son aquellas construidas con elementos más precarios, en ocasiones, pueden ocupar casas hechas con materiales más sólidos, al ser transportados equívocamente en los enseres o ropas contaminadas. En el verano pueden volar y así ocupar casas nuevas cercanas a los ranchos infestados. El ferrocarril lo trasladó, en ocasiones, a las grandes ciudades. (Fig. 1)

El *Triatoma infestans* ocupa toda la geografía de nuestro país al norte del Río Negro. Si bien existen "zonas endémicas" en algunas provincias, ninguna de ellas está exenta de su parasitación. Este reduvívoro está relacionado con la enfermedad de Chagas-Mazza o tripanosomiasis americana, en contraposición de aquella tripanosomiasis africana transmitida por las moscas Tsé-tsé. De tal manera, que mencionar a la vinchuca es asociar a la enfermedad de Chagas. (Fig. 2)

Este trabajo tiene por objetivo demostrar que el reduvívoro *Triatoma infestans*, es capaz de provocar en los habitantes de las "zonas endémicas" o provincias del norte argentino, otros trastornos no infecciosos y no relacionados con el *Tripanosoma cruzi*.

Así, en los lugares donde la polución de insectos es muy grande, aunando los desechos o restos momificados de los estadios ninfales más los de los adultos y todas sus excretas, que, difícilmente se remueven de los ranchos atestados de vinchucas, son inhalados (e ingeridos) en forma crónica por sus habitantes, así como, son transmitidos al medio ambiente circundante.

Se estudió así, la capacidad antigénica de estas proteínas heterólogas en un modelo animal, valorando la producción de anticuerpos específicos al igual que la capacidad para desarrollar una neumonitis por hipersensibilidad experimental.

Después de los hallazgos en los animales, se analizó el conjunto de cambios producidos en los habitantes de las llamadas "zonas endémicas" valorando la existencia de anticuerpos específicos en el suero de dichas personas afectadas o no por enfermedades respiratorias crónicas.

Además, se analizó la relación fisicoquímica entre las **proteasas antigénicas del *Triatoma infestans* y de la cucaracha *Periplaneta americana***, portadora de numerosos antígenos bien caracterizados (Bla g 1 a Bla g 6 y Per a 1 a Per a 7) cuyas propiedades fisicoquímicas se acercan mucho a las del Ti y generan patología en humanos con rinitis y asma bronquial, por eso la valoración de su reactividad cruzada, pareció de interés académico dado que uno es paradigma de parasitación rural y otro de infestación citadina.<sup>(1-7-9)</sup>

Dentro de la clasificación entomológica, la cucaracha pertenece al orden de los Orthópteros (del griego: orthos: derecho y pteron: alas), familia Blattidae o Blattaria que abarca a los insectos aplanados, de carrera rápida, con antenas largas y delgadas, ojos bien desarrollados y aparato bucal masticador con mandíbulas. En América, esta familia está representada por unas 70 especies; en todo el mundo se conocen más de 2000 especies.

El Bla g 1 tiene 7 tándems de 100 aminoácidos cada uno; Bla g 2 (36 kDa) tiene homología con la aspártico-proteasa del tipo pepsina, catepsina y quimosina. El Bla g 4 es una lipocalina extracelular que se une a moléculas hidrofóbicas; Bla g 5 (23 kDa) es una glutatión-S-transferasa y tiene 28% de homología con Der p8; Bla g6 (21 kDa) tiene homología con la troponina-C.

Por su parte, Pa expresa Per a 1 (25 kDa) con isoformas (Per a 1.0101, Per a 1.0103 y Per a 1.0104), Per a 3 (72 kDa) y Per a 7 (33 kDa) configuran los aspectos fisicoquímicos más salientes de estos antígenos de las cucarachas *Blatta germanica*, *orientalis* y *Periplaneta americana*.

### **Materiales y métodos.**

1.- **Antígenos:** un extracto de las estructuras exoesqueléticas del *Triatoma infestans* (Ti) y otro de la cucaracha *Periplaneta americana* (Pa) fueron preparados siguiendo las pautas metodológicas establecidas por Frugoni y Hansen para tal fin.

Los Ti fueron seleccionados cuidadosamente siguiendo reglas entomológicas

preestablecidas para los reduvídeos. Los insectos estaban libres de infección por *Trypanosoma cruzi*, habían sido alimentados con sangre de paloma durante su estadía en Citefa (Cipein-Conicet), y a la Profesora Consulta Adjunta Dra. Elvira Durante de Isola a quienes se agradece su inestimable colaboración.

En todos los casos, se emplearon insectos adultos para la elaboración de los extractos madre de Ti y de Pa. <sup>(22)</sup>

2. **Fraccionamiento por columna de Sephadex:** el extracto de Ti sin diluir fue pasado por una columna de Sephadex G-150 de 22 mm por 780 mm que se equilibró y eluyó con CINA-buffer-fosfato 0,15 M, a pH 8 y a 4°C. Una cantidad de 3,5 ml del Ti se pasó por la columna y se obtuvieron alícuotas de 1 ml del eluido a una velocidad de 20 ml/min. Los contenidos proteicos de cada eluido se midieron a 280 nm de densidad óptica en un espectrofotómetro Metrolab. Los contenidos de hexosas fueron establecidos por el método del indol utilizando una mezcla de galactosa y de manosa como soluciones estándar y leyendo en el espectrofotómetro a 470 nm de densidad óptica. <sup>(14)</sup>

La medición cuantitativa de las proteínas del Ti y de sus fracciones solubles se realizó por el método de Bradford.

### 3. **Modelos experimentales en animales:**

a.- **Conejos:** animales adultos fueron inmunizados con el extracto total mediante inyecciones intradérmicas semanales en el dorso. Cada inoculación estaba compuesta con 0,5 ml del Ti más 0,5 ml de adyuvante completo de Freund. Este mililitro se repartió en habones de 0,20 ml. Esta emulsión se administró durante 20 semanas hasta totalizar la incorporación de 1g. de Ti en cada animal. Diez días después de la última inyección, los animales fueron sangrados a blanco por punción cardíaca, y los sueros obtenidos fueron fraccionados en alícuotas y guardados a -20°C.

b.- **Cobayos:** veintiún animales adultos de 250-300 g de peso y libres de enfermedad evidente y de experiencias previas, recibieron durante 7 semanas (49 días), una cantidad diaria de 8 mg de los antígenos del Ti obtenidos por el fraccionamiento en columna. Estos 8 mg estaban disueltos en 10 ml de PBS y se administraron de la siguiente manera: un grupo de 7 animales se colocó en una campana de vidrio con un volumen de 6000 cm<sup>3</sup> conectada con un nebulizador ultrasónico que aerosolizó los 10 ml en un lapso de una hora produciendo partículas de 3 μ. Este procedimiento se repitió 3 veces para aerosolizar a todos los animales del grupo experimental.

Un grupo control similar de animales en cuanto a peso y virginidad de tratamientos previos, pero con 14 cobayos, fue utilizado como testigo de la experiencia al ser aerosolizado con PBS (10 ml) durante igual lapso, pero en una campana distinta, con igual capacidad y sin uso previo con ninguna sustancia.

Semanalmente, una hora después de la aerosolización, 3 cobayos del grupo experimental y 2 del grupo control, fueron sacrificados bajo anestesia con éter, según método convencional para estos casos. La sangre fue recogida y los sueros obtenidos se guardaron a -20°C. Los linfocitos fueron separados por un gradiente de Ficoll-Hypaque, según técnica estandarizada.

Las mismas maniobras se realizaron con los cobayos del grupo control.

Estos pasos se repitieron durante las 7 semanas, recogiendo los mismos elementos y rotulándolos adecuadamente. En la medida que los animales disminuían en número, se simplificaban los pasos antes descriptos (reiteración de las aerosolizaciones).

4.- **Pesos moleculares:** diversos marcadores proteicos de pesos moleculares conocidos se

emplearon como indicadores estándar; así, la lisozima (PM.:14,3 kDa), la beta-lactoglobulina (PM.:18,4 kDa); el tripsinógeno (PM.: 24 kDa); la pepsina (PM.: 34,7 kDa); la albúmina de huevo (PM.: 45 kDa); la albúmina sérica bovina (PM.: 66 kDa) y la alcohol dehidrogenasa (PM. 150 kDa) (Sigma Chemical Co.), fueron sometidos a pasaje por columna de Sephadex G-150. Cada proteína tenía una concentración de 13,5 mg en un volumen de 1,5 ml mientras que el Ti presentaba 45,5 mg en 3,5 ml (13 mg/ml). La columna de 780 mm por 22 mm se equilibró y se eluyó con buffer ClNa 0,15 M-PBS a pH 8 y a 4°C.

Un mililitro de cada sustancia fue colectada y sometida al espectrofotómetro a 280 nm de densidad óptica.

5. **Técnicas inmunológicas:** el extracto de Ti y sus fracciones solubles fueron testificados contra el antisuero de conejo anti-Ti por medio de la doble difusión de Ouchterlony, la hemaglutinación pasiva de Boyden, la contrainmunolectroforesis y la rocketelectroforesis. Con ellas se valoraron las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos y se determinaron los títulos respectivos. Los antígenos de Ti fueron concentrados 10 veces por evaporación y los antisueros se diluyeron según la metodología. Idénticos pasos se aplicaron con los sueros de cobayos aerosolizados. La técnica del MIF (inhibición de la migración de los macrófagos) se realizó para detectar poblaciones LT-específicamente sensibilizadas contra los antígenos de Ti. Todos estos ensayos celulares se hicieron por duplicación y con 3 concentraciones diferentes de los antígenos (10, 100 y 500 mcg/ml). <sup>(12-29)</sup>

Todos los cobayos fueron testificados en la piel del dorso con 0,10 ml (100 mcg) del antígeno Ti en PBS, 48 horas antes de ser sacrificados, semanalmente, para valorar la producción o no de induración local. <sup>(31)</sup>

Para certificar la existencia de anticuerpos citofílicos en los cobayos aerosolizados (IgE o IgG<sub>1</sub>), se apeló a la técnica de Ovary-Bier o anafilaxia cutánea pasiva. <sup>(30)</sup>

De tal manera, cobayos albinos adultos de 250-300 gr fueron inyectados en la piel rasurada del dorso de estos animales vírgenes de todo tratamiento, con los sueros de los animales aerosolizados con Ti, sin diluir, en habones de 0,10 ml, en una disposición parasagital en el hemidorso izquierdo. En el hemidorso derecho, por su parte, se inyectaron habones de igual volumen de suero normal de cobayo.

A las 24 horas, estos cobayos fueron inyectados por la vena safena de la pata posterior, previamente disecada, con una mezcla de antígenos de Ti (0,5 ml de la solución de 13,5 mg/ml) más 0,5 ml de colorante (Azul de Evans al 1% en PBS).

Después de 30 minutos, cada cobayo fue anestesiado con éter sulfúrico en una campana depuesta para tal fin, y, una vez muerto, fue disecada la piel del dorso, y valoradas por la cara interna la presencia o no de manchas azules consecutivas a la extravasación del colorante indicador en la dermis.

Indirectamente, estas manchas azules eran indicadoras de una reacción antígeno-anticuerpo inductoras de vasodilatación capilar intensa (fenómeno anafiláctico localizado) y, por lo tanto, de positividad reactiva.

Esta técnica no discrimina entre IgE e IgG<sub>1</sub>, pero ratifica la citofilia del anticuerpo en estudio como propiedad biológica sobresaliente. Estas pieles pueden ser fotografiadas de forma convencional a los fines documentales.

Por medio de la clásica técnica de las absorciones, se valoró la existencia (o no) de epitopes o determinantes antigénicos comunes en el Ti y en la cucaracha Periplaneta americana (Pa).

Los extractos de Ti y de Pa fueron testificados contra los antisueros de conejos, anti-Ti y anti-Pa, por medio del Boyden (hemaglutinación pasiva). Cada sistema antígeno-anticuerpo

fue investigado en forma directa (Pa-anti-Pa y Ti-anti-Ti) y en forma cruzada (Pa contra anti-Ti y Ti contra anti-Pa), después de cumplimentar los pasos siguientes.

Un mililitro de cada antisuero fue incubado a 37° C en un baño de María, durante una hora con 100 mg de Pa liofilizado previamente; la absorción opuesta, es decir, un mililitro de los mismos sueros fueron incubados con 100 mg de Ti, en similares condiciones. Se obtuvieron de esta manera 4 nuevos antisueros absorbidos que se probaron como si fueran los originales en la prueba de Boyden (v.g.: sueros anti-Ti absorbidos con Ti y con Pa y sueros anti-Pa absorbidos con Pa y con Ti).

La ulterior determinación de los títulos respectivos posibilitó las comparaciones en los resultados y su tabulación.

6.- **Prueba de la desgranulación de los basófilos**: Esta técnica se desarrolló siguiendo los pasos aconsejados por Benveniste y la lectura por Feliú. <sup>(11-19-20)</sup>.

No obstante, para brindar más estabilidad a las células procesadas, se introdujeron pequeñas modificaciones. Así, en lugar de EDTA-bifosfato se empleó EDTA-trifosfato y en cambio de la solución Tris-Tyrode se usó un buffer de PBS- Ca<sup>++</sup>- Mg<sup>++</sup>.

Los basófilos fueron fijados con metanol en lugar de ser secador por aire caliente y coloreados con azul de toluidina al 0,025%.

7. **Isoelectroenfoque**: Se realizó en capas delgadas de gel de agarosa con un rango de pH entre 4.0 - 6.5 siguiendo las especificaciones para tiempo de corrida e intensidad de la corriente del fabricante (Bio-Rad). Una mezcla estándar de marcadores proteicos con pH entre 3.5 - 9.5 se utilizó como monitor del gradiente de pH. El pH de cada banda individual fue determinado a punto de partida de la curva de calibración de las proteínas estándar. Luego de completada la corrida, la mitad del gel fue removida, fijada durante una hora y coloreada durante 20 minutos, en azul de Coomassie R-250 al 0,1%, inicialmente calentado a 60°C. <sup>(18- 27- 32- 36)</sup>.

8.- **Electroforesis capilar** : esta técnica analítica de gran capacidad resolutive en el estudio de estas glucoproteínas antigénicas de insectos del hábitat fue desarrollada en los laboratorios de Bio-Rad (Hércules, California, EEUU). Se llevó a cabo con un sistema Bio-Focus 3000 siguiendo estrictamente las especificaciones del laboratorio en lo relativo a tiempo de corrida y potencia eléctrica. Se corrieron separadamente antígenos de la Pa, de las mudas o estadios ninfales del Ti y del adulto. Por último, se valoró la superposición de imágenes o trazados de los antígenos. Ello probaría la reactividad cruzada entre ambos a concentraciones equivalentes.

9. **Electroforesis en gel de poliacrilamida**. SDS-PAGE fue preparado por el método de Laemmli empleando el gel al 15% y corriéndolo en un aparato Mini-Protean II. Veinte microlitros de Ti y de Pa fueron cargados en orificios separados en condiciones diferentes de reducción y calentamiento para la detección de proteínas con azul brillante de Coomassie R-250 y luego la transferencia a una membrana de nitrocelulosa.

10. **Ensayos de actividad enzimática**. Minigeles de 10 por 10 cm cada uno y de 1,5 mm de espesor compuestos por acrilamida al 12% según la técnica de Laemmli con el agregado de gelatina a una concentración final del 0,2%. Las corridas se hicieron a 130 V durante 2 horas. Cuando se empleó el azul de bromofenol como marcador que alcanzó el tope, la corrida fue detenida y los geles lavados 2 veces en agua destilada con Tritón-X-100, al 0,15% por 15 minutos y luego incubados a 37° C en 0,1% de 2-[N-morfolino] etano-ácido sulfónico (MES) buffereado a pH 6, en Tris-AcH 100 mM a pH 3,5 y en Tris-ClH 100 mM a pH 8,5 conteniendo 0,5 mM de dithilthreitol (DTT).

La reacción se detuvo y las proteínas fueron coloreadas por incubación a temperatura ambiente con 0,25 ml de azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-ácido acético-agua 5:1:5 (v/v/v).

Después de la decoloración con metanol al 20% y ácido acético al 10% las bandas activas se observaron como decoloradas sobre un fondo azul. <sup>(10-24-25)</sup>.

11. **Ensayos inhibitorios.** El lavado y la incubación de los geles se realizó con y sin los inhibidores de las proteasas. Las soluciones empleadas fueron: el E-64(L-trans-epoxi-succinil-leucilamido [4-guanidino]-butano en 20  $\mu$ M; el TLC (tosil-lisil-cloro-metilcetona) en 100  $\mu$ M; el TPCK (tosil- fenil- alanil-cloro-metilcetona) en 1 mM; el PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) en 10 mM; la leupeptina en 100  $\mu$ M; la o-fenantrolina 1mM y la pepstatina -A en 2  $\mu$ M.

Los pesos moleculares de los marcadores proteicos utilizados fueron: fosforilasa-b (97,4 kDa), albúmina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de la tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

Para los geles activados, las muestras no fueron ni reducidas ni calentadas antes de la siembra.

12. **Western-blots.** Las muestras con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol y calentamiento fueron corridas en SDS-PAGE con el 15% de poliacrilamida estándar, electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas durante 2 horas con una solución conteniendo albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 2%, Tween-20 al 0,01% en PBS pH 7,2 v/v y luego incubadas durante toda la noche con un suero de conejo policlonal anti-Ti 1/400, un suero humano anti-Ti 1/10 y un suero humano anti-Pa 1/5.

Luego de la incubación durante toda la noche con los antisueros mencionados, las membranas fueron lavadas repetidamente y, luego, incubadas con un 1/3000 de suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, y con un 1/500 de suero de conejo anti-IgE específica para cadenas épsilon conjugado con peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente.

La detección colorimétrica fue realizada con  $\alpha$ -cloronaftol y peróxido de hidrógeno.

13. **Pacientes:** Fueron agrupados de la siguiente manera:

a) cincuenta atópicos vírgenes de todo tratamiento inmunoterápico, con edades entre 22 y 48 años, comprendían a 27 mujeres y 23 hombres y sufrían de rinitis perenne y asma bronquial, seleccionados de acuerdo con lo establecido por la American Thoracic Society, y vivían en las provincias de Santiago del Estero, Chaco, Corrientes y Misiones, por lo menos, desde 10 años antes;

b) un grupo similar en número y atopía, con edades comprendidas en idéntico rango y proporción de sexos, pero, residentes en la ciudad de Buenos Aires y sufrientes del mismo padecimiento respiratorio;

c y d) como grupos controles de a y b, se incorporaron a 25 pacientes con patologías traumatológicas, prequirúrgicos, voluntarios sanos, que no sufrían ninguna enfermedad respiratoria o inmunológica y que residían en la misma zona endémica del Ti, por un lado, y en la ciudad de Buenos Aires, por el otro. Estos últimos 50 sujetos no tenían antecedentes heredofamiliares de atopía y poseían una IgE sérica total < 50 KU/L.

Tanto los pacientes atópicos como los controles no-atópicos, vivieran en un área endémica para Ti o en Buenos Aires, -área no endémica-, fueron testificados intracutáneamente,

luego de cumplimentar con el consentimiento informado.

14. **Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata:** el extracto de Ti y sus fracciones solubles se esterilizaron por filtros Millipore (0,22  $\mu$ m). Cada paciente recibió por la vía intradérmica en el brazo (cara externa), 0,025 ml del Ti 1/100 y de los picos proteicos obtenidos por Sephadex G-150 (tubos 18-21 y 45-55). Como controles se utilizaron habones de igual volumen de solución fisiológica estéril pH 7,2 e histamina 1/1000. Se leyeron a los 15 minutos y se valoró la producción del eritema y pápula en comparación con el habón histamínico que había alcanzado su máximo nivel reaccional. Se documentó dentro de los siguientes valores: 0: sin reacción; 1+: 1-4 mm; 2+: 5-9 mm; 3+: 10-14 mm y 4+: más de 15 mm. Las pruebas siempre se realizaron por la mañana y por la misma persona, luego de firmar el consentimiento de Helsinki.

En el momento de las pruebas, y desde 7 días antes, ninguno de los sujetos estaba ingiriendo antihistamínicos, corticoides por vía general o inmunodepresores.

15. **Radioinmunoensayos:** la IgE sérica humana se midió por el método del PRIST (Phadebas, Pharmacia, Uppsala, Suecia) siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Los valores se expresaron en KU/L (kilo unidades por litro). Los valores para los adultos normales de nuestra población son inferiores a 120 KU/L. La IgE específica (sérica) contra los antígenos del Ti, o método del RAST, se realizó con las mismas muestras, habiendo preparado la fase sólida con Ti (13mg/ml de proteínas) unido covalentemente a los discos de celulosa (SS547) bajo tratamiento con bromuro de cianógeno a pH 11 durante 2 horas en un medio alcalino.

Se midió en PRU/ml (Phadebas RAST Units) de acuerdo a la escala siguiente: menos de 0,35 PRU/ml: sin significación; entre 0,35 - 0,70 PRU/ml con significación (es decir, presencia de IgE específica) corresponde a la antigua denominación de clase 1, entre 0,70-3,50 PRU/ml corresponde a la clase 2; entre 3,50 y 17 representa a la clase 3 y, por encima de ellas, o sea 17 o más PRU/ml a la anterior clase 4. Todas ellas (clases 2, 3 y 4) significan títulos elevados de IgE sérica específica para un determinado antígeno.

La inhibición del RAST o RAST-inhibición es una técnica que sirve para establecer la especificidad del RAST contra un antígeno determinado. Consiste en absorber el anticuerpo que se investiga con dosis crecientes del antígeno (Ti) que se conoce, in vitro, y volver a realizar la técnica del RAST con las nuevas muestras del antisuero. También se utilizan otros antígenos no relacionados con el conocido, en nuestro caso, se emplearon pólenes de Ambrosia, de gramíneas y escamas del gato que no poseen relación con el Ti, con los cuales se intenta anular a los anticuerpos IgE específicos contra el Ti.

Se lee y se transporta a un gráfico donde la abscisa registra la concentración antigénica y las ordenadas el porcentaje de inhibición. (8-14-23).

16. **Histopatología:** los órganos obtenidos de las experiencias en cobayos fueron fijados en formol 10% y sometidos a los pasos convencionales (alcohol-xilol-parafina-cortes de 6  $\mu$ -xilol-alcohol-colorantes) para obtener los preparados histológicos.

Los colorantes empleados fueron hematoxilina-eosina, PAS y azul de toluidina 1%. Los signos objetivos de neumonitis por hipersensibilidad a nivel histopatológico se basaron en el hallazgo de: bronquiolitis celular, infiltrados intersticiales y granulomas no caseosos. Estos hallazgos agregados a las células gigantes multinucleadas, a las células espumosas intraalveolares, a la neumonía organizada, a la bronquiolitis obliterans y a la fibrosis intersticial, fueron estratificados en 5 grupos. Así, el grupo 1 comprende bronquiolitis celular con linfocitos y plasmocitos infiltrando los bronquiólos sin afectación de los sacos



alveolares; el epitelio bronquiolar permanece intacto y la luz tubular presenta muy escaso exudado. El grupo2, por su parte, expone infiltrados intersticiales más ricos en linfocitos y plasmocitos, que también involucran a las paredes alveolares. El grupo3, revela la aparición de granulomas solitarios, no caseosos, distribuidos al azar en el parénquima, las paredes bronquiolares y las alveolares sin afectación de las paredes vasculares. El grupo4, muestra la presencia de histiocitos epitelioides, que se agrupan e imitan a los granulomas en los alvéolos con o sin el acompañamiento de células gigantes. Estas, solitarias o en grupos, presentan inclusiones de colesterol, los cuerpos asteroides y los de Schaumann. Por último, el grupo5, de mayor deterioro, presenta una neumonía organizada, bronquitis obliterante y fibrosis intersticial.

Las microfotografías fueron tomadas por un microscopio Unic a 100X, 400X y 1000X con una película Afga Color de 21° Din (100 ASA). (16-21-26-33-35-37).

### **Resultados**

1.- El fraccionamiento del extracto de Ti por una columna de Sephadex G-150 permitió obtener 3 picos proteicos definidos correspondientes a los tubos 18-21, 22 y 45-55, y 3 picos con elevado contenido de hexosas en los tubos 15-25, 36 y 42-48. El método de Bradford reveló los siguientes contenidos proteicos: extracto de Ti: 13 mg/ml; tubo 20: 3600/mcg/ml; tubo 22: 150 mcg/ml y tubo 50: 6800 mcg/ml. El método de indol detectó los siguientes contenidos de hexosas: extracto de Ti: 920 mg%; tubo 20: 240 mg%; tubo 36: 30 mg% y tubo 45: 600 mg%. De los hallazgos se deduce la composición glucoproteica del extracto de Ti. Por medio de un colector de fracciones se obtuvieron alícuotas de 1 ml que permitieron estudiar el peso molecular del extracto de Ti. Así, 7 picos correspondientes a la lisozima, beta-lactoglobulina, tripsinógeno, pepsina, albúmina de huevo, albúmina sérica bovina y alcohol-dehidrogenasa, fueron obtenidos. Cada pico fué testificado por inmunodifusión doble de Ouchterlony contra un antisuero de conejo anti-Ti y contra un antisuero contra la albúmina sérica bovina. Bandas de precipitación se detectaron con albúmina sérica bovina en el segundo tubo mientras que el Ti mostró bandas de precipitación entre la alcohol-dehidrogenasa y la albúmina sérica bovina.

Los pesos moleculares de los 7 indicadores proteicos fueron transportados a una escala semilogarítmica, que, en la abscisa indicaba la relación entre los volúmenes de elución y muerto, y en la ordenada, los kilodaltons. El valor extrapolado del extracto de Ti resultó de 92 kDa aproximadamente. (Figs. 3 y 4).

La inmunización en conejos con el extracto de Ti brindó un antisuero que se reveló francamente positivo al ser testificado con técnicas convencionales. Así, el anti-Ti mostró 3 bandas de precipitación (Ouchterlony) frente al Ti mientras que, al usar las fracciones solubles sólo la proveniente de los tubos 18-21 reveló una única banda de precipitación. Como control, el anti-Ti fué aprobado contra extractos de Dermatophagoides y de Ambrosia, no revelando ningún resultado positivo. También resultaron negativos los sueros humanos de los 4 grupos en estudio, al enfrentarlos contra el Ti por Ouchterlony. Ello ratifica la ausencia de precipitinas en los humanos residentes en zonas endémicas y no-endémicas. (Fig. 5).

La contraelectroforesis y rocketelectroforesis también revelaron bandas de precipitación en los sistemas Ti-anti-Ti y en reacciones cruzadas con la Pa, lo cual avala, en parte la existencia de epitopes comunes a ambos antígenos. La primera de ellas también confirmó la positividad de las fracciones de Ti. (Figs. 6 y 7).

La hemaglutinación pasiva de Boyden con glóbulos rojos tanados con Ti, demostró la

existencia de anticuerpos específicos en altos títulos (1:4096) al probar Ti-anti-Ti, pero títulos más bajos al reaccionar con las fracciones solubles; así, las provenientes de los tubos 18-21 reveló 1:256 y la de los tubos 45-55 reveló 1:64.

Las absorciones de los sueros de conejo contra Ti y contra Pa realizadas con Ti y Pa, respectivamente, en forma directa y cruzada, según metodología descrita con antelación, dieron resultados positivos que se consignan en la Tabla 1.

Se detectaron absorciones cruzadas entre los antígenos y los antisueros, siendo más marcadas aquellas determinadas por la Pa más que por el Ti, presumiblemente, por su mayor riqueza proteica y antigénica, y, por razones fisicoquímicas de interferencia inespecífica.

Estos hallazgos, sumados a otros, refuerzan la reactividad cruzada entre ambos antígenos. La prueba de producción del factor inhibidor de la migración de los macrófagos resultó positiva al utilizar linfocitos de conejo separados en el mismo acto de la sangría a blanco descrita para obtener los sueros hiperinmunes. Similar prueba reveló linfocitos específicamente sensibilizados en el modelo experimental con cobayos por la vía inhalatoria, tal como se documenta en la tabla correspondiente.

Por su parte, los linfocitos de seres humanos atópicos y no-atópicos, dieron negativa esta prueba del MIF, con las concentraciones establecidas oportunamente.

Las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada realizadas en los cobayos aerosolizados con Ti fueron positivas desde la quinta semana de inhalación crónica.

La prueba de anafilaxia cutánea pasiva o test de Ovary-Bier, reveló positividad desde la sexta semana de aerosolización de Ti en los cobayos experimentales documentando la síntesis de anticuerpos citofílicos específicos contra un antígeno inhalado crónicamente.

La prueba de degranulación de los basófilos realizada únicamente con células humanas reveló intensa positividad (80%) en presencia del Ti, en los pacientes atópicos residentes en zona endémica en contraposición de la escasa desgranulación de los otros 3 grupos estudiados.

Las concentraciones óptimas del antígeno fueron  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ . La reacción parece ser  $Ca^{++}$  dependiente.

**1.- Inmunotransferencia:** conjuntamente con el isoelectroenfóque reveló, por lo menos, 13 diferentes bandas de proteínas (antígenos potenciales). Al incubar con los antisueros marcados con radioisótopos (I-125) se detectó una positiva unión a 3 proteínas. Estas podrían ser coincidentes con aquellas fracciones solubles obtenidas por Sephadex G-150, es decir, los tubos 18-21, 22 y 45-55. Los patrones coincidentes estarían a un pI de 4.5 -5.0. (Figs. 8, 9 y 10 ).

La actividad gelatinolítica del Ti en el SDS-PAGE con gelatina copolimerizada como sustrato fue notable a 56 kDa. El patrón de la actividad proteolítica del Ti fue analizado a 3 diferentes pHs, 4,5; 6,5; y 8,5. La mayor actividad enzimática se halló a pH 8,5 con menor actividad a pH 6,5 y a pH 4,5.

Este patrón de actividad a pH 8,5 fue altamente sensible al PMSF sugiriendo que tentativamente podría tratarse de una serina-proteasa. ( Figs. 27 a 30 ).

Cuando el Ti fue separado por SDS-PAGE, transferido a membranas de nitrocelulosa e incubado con un suero de conejo policlonal anti-Ti, las bandas de 15 kDa, 18kDa y 36 kDa mostraron inmunoreactividad, pero una sola banda de 28 kDa mostró reactividad cruzada con el extracto de Pa. Por otro lado, un suero humano anti-Pa reconoció bandas de 28 kDa en la Pa y reactividad cruzada con algunas bandas en Ti (14 kDa, 35 kDa, 36 kDa y 75

kDa).

Un suero humano anti-Ti reconoció 2 bandas (17 kDa y 58 kDa) con su propio antígeno mientras que en las reacciones cruzadas con Pa se detectan 2 bandas a 28 kDa y 45 kDa.

1.- **Pacientes y pruebas cutáneas:** el grupo control no-atópico de Buenos Aires (d) no mostró ninguna reactividad cutánea al Ti ni a sus fracciones, así como tampoco evidenció ninguna respuesta al ácaro Dermatophagoides, la cucaracha Periplaneta americana y el pólen de Ambrosia. El grupo (c) o control de zona endémica mostró un solo paciente, sobre los 25, con prueba cutánea inmediata positiva, pero negatividad para todos los otros antígenos mencionados. (Figs. 11 - 12- 13 y 14).

Los grupos atópicos (a y b) de zona endémica y de Buenos Aires, mostraron la siguiente reactividad: el primero, 18 de los 50 pacientes evidenciaron pruebas cutáneas positivas al Ti y a las fracciones 18-21 y 45-55, al igual que el polvillo habitacional y sus ácaros, mientras que la cucaracha Periplaneta americana sólo fue positiva en 5 casos de ellos.

En el grupo (b) de la ciudad de Buenos Aires, sólo un paciente reveló positividad cutánea a Ti y a la cucaracha Periplaneta americana.

1.- **Radioinmunoensayos:** los grupos controles de las provincias norteañas y de Buenos Aires, revelaron valores de la IgE sérica total dentro del rango 22 - 71 KU/L, mientras que, los atópicos de ambas áreas presentaron entre 125 y 1410 KU/L, con promedios de 720 KU/L para Buenos Aires y 640 KU/L para los norteaños.

La IgE- RAST específica para los antígenos del Ti resultó positiva en 6/50 pacientes del grupo (a) con 0,35 PRU/ml (clase 1) y para 9/50 con 0,70 PRU/ml (clase 2) mientras que los 35 restantes, así como todos los de los grupos controles revelaron negatividad manifiesta.

El RAST-inhibición probó fehacientemente la especificidad de la reacción de los anticuerpos IgE-anti-Ti lográndose el máximo de inhibición (cerca al 100%) con Ti mientras que las absorciones con otros antígenos (Ambrosia, gramíneas y gato) no fueron capaces de bloquear la reactividad de dichos anticuerpos específicos y, por ende, su porcentaje de inhibición fue despreciable (entre un 15-25 %) inducido exclusivamente por fenómenos fisicoquímicos inespecíficos.

La inhibición de los anticuerpos IgE- anti-Ti fue dependiente de las dosis del antígeno (Ti) empleadas en las incubaciones sucesivas. De tal manera, con cantidades de  $10^{-6}$  y de  $10^{-5}$  del antígeno, la inhibición fue mínima mientras que con  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  la curva sigmoidea comienza a dibujarse alcanzando su meseta entre  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ .

Los antígenos empleados como controles no relacionados con el Ti, no lograron bloquear las propiedades de los anticuerpos IgE contra él y proveyeron una curva casi plana al emplear las mismas concentraciones desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-1}$ .

6.- **Electroforesis capilar:** esta técnica demostró gráficas similares para el Ti, la Pa y los estadios ninfales del Ti, las que al superponerse casi eran coincidentes lo cual ratifica la existencia de epitopes comunes -aunque no necesariamente iguales- en ambos extractos y que se expresarían tempranamente en el Ti. (Figs. 16 -17 y 18 ).

7.- **Histopatología:** los exámenes microscópicos de los pulmones, riñones, bazo e hígado de los cobayos controles aerosolizados con PBS a todo lo largo de la experiencia de 7 semanas, no revelaron ninguna alteración tisular digna de mención. En el grupo experimental aerosolizado con los antígenos del Ti, por su parte, se apreciaron lesiones histopatológicas que se describen así: (Figs. 19 y 20 ).

1.a) durante las 2 primeras semanas, no se detectaron cambios de significación salvo escaso exudado en la luz bronquial y bronquiolar con epitelio intacto;

2.b) durante la 3ª y 4ª semanas, la riqueza celular de los bronquiólos se incrementó y cordones de linfocitos y plasmocitos fueron diagnosticados constituyendo una bronquiolitis;

3.c) durante las 3 últimas semanas, el infiltrado intersticial fue en aumento modificándose de moderado a intenso con engrosamiento de las paredes alveolares. También se apreciaron los granulomas no caseosos, en forma solitaria en el parénquima pulmonar con distribución errática. En algunos alvéolos se observan agrupamientos de células gigantes y de histiocitos epitelioides. (16-33-35-37).

El azul de toluidina no reveló células metacromáticas (mastocitos) en los tejidos controles o experimentales. El PAS, por su parte, reveló engrosamiento de las membranas basales pulmonares y renales; en pocos casos, en el pulmón se apreció una alteración de dicha membrana en forma de fenestraciones. (Figs. 21 a 26).

**Discusión:** Se exponen los datos obtenidos en modelos experimentales y en humanos acerca de la inducción de anticuerpos específicos a antígenos del *Triatoma infestans* en residentes de provincias del norte y noreste argentino donde la polución ambiental a dichos elementos se considera elevada.

Estos hallazgos, absolutamente originales para nuestro país y presumiblemente para toda América Latina, sólo registra como antecedente a los casos de choque anafiláctico producido en el estado de Texas (EE.UU.) por la picadura de la vinchuca en trabajadores rurales.

En estos pacientes el antígeno de la saliva del *Triatoma* fue inoculado reiteradamente mientras que en nuestros enfermos, se inhaló crónicamente. Es decir que en nuestro caso, se incorpora la vinchuca a la lista de insectos productores de alergia respiratoria inhalada, como lo hacen los ácaros y la cucaracha.

Desde 1964 en que Voorhost demostró el papel del *Dermatophagoides* en la rinitis atópica perenne y en el asma bronquial, mucho se estudió acerca del papel de éstas moléculas glicoproteicas en la interacción insecto-huésped. <sup>(38)</sup>.

También las cucarachas *Periplaneta americana*, *Blatta germánica* y *Blatta orientalis*, demostraron su potente alergenización en humanos atópicos y, hoy en día, pocas dudas existen sobre su papel en la génesis de alergias respiratorias crónicas.

También la inmunología detectó las propiedades inmunizantes de los antígenos de las cucarachas, desarrollándose en estos momentos técnicas para el estudio del ADN de las diferentes especies y las respectivas homologías entre ellas.

Idénticos pasos se siguieron con el *Triatoma infestans*, otro insecto muy común en nuestro vasto territorio; se asume que 2/3 de dicha superficie está parasitada con el insecto, tanto en sus especies hematófagas como fitófagas.

Está en desarrollo el estudio inmunológico de ejemplares de ambas especies con el propósito de determinar los antígenos comunes que comparten y, que a los fines inmunopatológicos, sean capaces de desencadenar una activación inductora de lesión tisular.

Sea como fuere, estos antígenos son incorporados en forma reiterada por los habitantes de diversas zonas de nuestro país y, por ende, de la población atópica, peligrosamente expuesta.

Los resultados de este trabajo prueban que los antígenos del *Triatoma infestans* son glucoproteínas de alto peso molecular y de estructura compleja, con lo cual, cumple dogmáticamente con lo que se requiere para que una molécula se comporte como antigénica. Por su parte, la inoculación de estas moléculas purificadas en un modelo experimental en

conejos, ratificó aquella presunción, induciendo anticuerpos específicos del tipo IgG en alto título, tal como lo probaron diversas técnicas serológicas.

Otro modelo experimental, en cobayos, intentó reproducir las condiciones ambientales en las cuales la polución de los antígenos del *Triatoma infestans* fuera elevada. Quizás las concentraciones proteicas a las que fueron sometidos los cobayos fueran superiores a aquellas de los hábitats parasitados, pero de todas maneras, esta aerosolización crónica indujo lesiones pulmonares indiscutibles y también una respuesta inmune específica demostrada tanto en su vertiente humoral como celular. Esta es la diferencia con la inhalación de partículas inertes (coniosis) capaces de provocar daño pulmonar, pero ineptas para inducir anticuerpos específicos o linfocitos sensibilizados.

De estos hallazgos, se puede especular asumiendo que ésta inhalación crónica podría desencadenar otros fenómenos de hipersensibilidad en los humanos distintos a aquellos mediados por la IgE (tipo I de Gell & Coombs).

Los estudios broncoalveolares de estos pacientes permitirían acercarse a un mejor conocimiento de este dilema, más aún, si se pudieran establecer patrones de citoquinas o la existencia de ARNm intracelulares correspondientes a dichas citoquinas y/o sus receptores.

Como modelo experimental en animales, se presume que éste es el primer aporte al tema; su especificidad queda aseverada por la existencia de anticuerpos específicos y linfocitos sensibilizados.

La presencia de anticuerpos IgG específicos no descarta la existencia de complejos inmunes circulantes *Triatoma*-anti-*Triatoma*, lo cual debería ser considerado como un epifenómeno y no como generadores de lesión pulmonar directa mucho más relacionada con la activación de macrófagos y de linfocitos.

Sin embargo, dichos complejos podrían ser amplificadores de la respuesta inmune inflamatoria, merced a su actividad a través de los receptores Fc de dichos macrófagos alveolares.

Los infiltrados de los tabiques alveolares se presentan muy ricos en células mononucleares e histiocitos, conduciendo a una franca desestructuración de la arquitectura pulmonar en función del tiempo de exposición.

Un modelo actualmente en desarrollo analiza el comportamiento de la ciclosporina-A como preventivo del desarrollo de la neumonitis por hipersensibilidad a un antígeno dado.

Los granulomas solitarios y no necrotizantes o caseosos también aparecen en las etapas finales del experimento; no obstante, su riqueza en células epitelioides no es franca.

Tampoco se pueden detectar células metacromáticas (mastocitos) en los infiltrados, pues su presencia podría jugar un papel importante en la perpetuación y amplificación de la inflamación. Además, un anticuerpo citofílico, presumiblemente una IgE o una IgG1 fué detectada en las últimas semanas por la prueba de la anafilaxia cutánea pasiva. Ella podría generar nuevas activaciones celulares a través de receptores épsilon de alta y baja afinidad.

Los hallazgos en humanos atópicos residentes en la llamada zona endémica (Santiago del Estero, Chaco, Corrientes y Misiones) prueban la síntesis de un anticuerpo citofílico como la IgE, de un trascendente papel en los fenómenos de hipersensibilidad inmediata, reagénica o anafiláctica.

Esta inmunoglobulina podría jugar un papel en los cuadros clínicos de rinitis perenne y asma bronquial, que sufren los afectados de dicha zona. La presencia de pruebas cutáneas positivas en ellos, y no en otros igualmente afectados que viven en Buenos Aires (área no endémica y control positivo de la experiencia) también constituye un hallazgo probatorio de

la capacidad sensibilizante de estas moléculas glucoproteicas.

El RAST ratifica dicha existencia al dosar cantidades significativas de este anticuerpo específico contra el *Triatoma infestans* en los sueros de atópicos afectados y residentes en zona endémica, en contraposición con los sueros de enfermos que viven en Buenos Aires y sensibles a los ácaros *Dermatophagoides* y a la cucaracha *Periplaneta americana*. (15-34-38).

El antisuero de conejo contra el Ti reconoce determinantes antigénicos en un extracto de la Pa. Estos hallazgos promueven una línea de investigación que, inicialmente, certifica la existencia de epitopes comunes a los 2 insectos. Así, 13 proteínas con pI entre 1.0 y 6.5 exhibirían parecidas propiedades fisicoquímicas aunque presentarían diferentes afinidades por los inmunosueros específicos en la técnica de la inmunotransferencia. Sin embargo, 3 de esas proteínas parecer ser coincidentes; ello implica que, si también son inmunogénicas como se supone, el humano atópico está expuesto a una sensibilización y ulterior desarrollo de una condición inmunopatológica.

Así, un residente de Buenos Aires con hipersensibilidad a los antígenos de la cucaracha Pa, sufrirá una agresión inmunológica y clínica al exponerse a antígenos del Ti si se traslada y reside en la llamada zona endémica. El hecho opuesto también sería válido porque si hay antígenos compartidos entre ambos insectos, los aspectos epidemiológicos de las enfermedades atópicas del aparato respiratorio, basados principalmente en la evitación o desalergenización tan preconizados, serían de relativo valor, habida cuenta de la polución franca de la cucaracha (y sus detritus) en el ambiente citadino como del *Triatoma* (y sus mudas y estadíos ninfales) en el hábitat rural, y en especial, del norte y noreste argentino.

Sobre la base de la actividad gelatinolítica podría asumirse que para el Ti son serina proteasas, tripsina o simil-tripsina, a pH 8,5, y con bandas inmunoreactivas a 78 y 65 kDa mientras que para la Pa serían proteasas a pH 6 del tipo cisteína y/o serina, tripsina o simil-tripsina, con bandas inmunoreactivas a 90, 78 y 65 kDa, respectivamente. (Figs. 27 a 30).

Queda demostrada así la **capacidad sensibilizante del *Triatoma infestans* y la reactividad cruzada con antígenos de las cucarachas** lo cual empeora la situación clínica de los asmáticos al verse más expuestos en zonas geográficas del país o de América Latina mucho más amplias que las grandes ciudades o las extensiones rurales argentinas y americanas. Si la **temperatura ambiente** se modifica en 1 ó 2 grados en el futuro, la pululación de estos insectos será mayor y la polución ambiental crecerá en forma notable empeorando la patología respiratoria de los afectados. Estos hallazgos refuerzan aún más la necesidad de disponer estrategias diversas para combatir a ambos insectos. (39-40-41).

### **Bibliografía**

- 1.- Alonso A., Scavini L.M., Albónico J.F., Mouchián K.: "Immunochemical properties of the antigens of *Blatta americana*". *Allergol et Immunopathol.*, 1987; 15: 109.
- 2.- Alonso A., Albónico J.F., Belloti M., Mouchián K., Pionetti C.H. "Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by the antigens of *Periplaneta americana*". *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1992; 2: 263.
- 3.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Belloti M., Pionetti C.H. "Producción de anticuerpos IgE-anti-*Periplaneta americana* en cobayos por vía inhalatoria" *Prensa Med. Argent.* 1993; 80: 100
- 4.- Alonso A., Albónico J.F., Isola E.D., Scavini L.N., Mouchián K. "Cross-reactivity between antigens of *Blatta americana* and *Triatoma infestans*" XIII International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Montreaux (Suiza), 1998

- 5.-Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M. "Immunochemical properties of the antigens of *Triatoma infestans*.  
J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1992; 2: 154
- 6.-Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M. 'Anticuerpos IgE-anti-*Triatoma infestans* en humanos atópicos y no-atópicos '  
Prensa Méd. Argent. 1994; 81: 300
- 7.-Alonso A., Caccuri R., Scavini L., Rodríguez S., Marino G. 'Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by *Triatoma infestans* antigens"  
J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1994; 4: 197
- 8.-Anderson M.C., "Methodology for RAST-inhibition" In: Methods of the allergenic products. FDA. Bethesda 1986; 1-17
- 9.-Atías A., Neghme A. "Parasitología clínica" Edit. Mediterráneo. Santiago de Chile, 1993
- 10.-Barret A.J. "Classification of peptidases". Meth. Enzymol. 1994; 244: 1-5
- 11.-Benveniste J. "The human basophil degranulation test as an vitro method for the diagnosis of allergies" Clin. Allergy, 1981; 11: 1
- 12.-Boyden S.V. "The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera" J. Exp. Med. 1951; 93: 107
- 13.-Boyum A. "Ficoll-Hypaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood" Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1966; Suppl., 77
- 14.-Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem.,1976; 72: 248-254.
- 15.-Ceska M., Erikson R., Varga J.M. "Radioimmunosorbent assay of allergens"  
J. Allergy Clin. Immunol. 1986; 78: 436
- 16.-Chapman M.D., Marshal N.A., Saxon A. "Identification and partial purification of species specific allergens from *Triatoma protracta*" J. Allergy Clin. Immunol. 1986; 78: 436
- 17.-Coleman A., Colby T.V. "Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis" Am. J. Surg. Pathol. 1988; 12: 514
- 18.-Crowle A. (edit.) "Immunodiffusion" Academic Press, New York, 1961
- 19.-D'Andrea A. L., Torres Leedham V. M., Castagnino J. M. "Isoelectrofocusing in agarose: clinical applications" Electrophoresis 1985; 6: 468
- 20.- Dische Z. In: Methods of Biochemical Analysis. Vol. 2. Edic. D. Glick, New York, 1955; 200
- 21.- Feliú X., de la Cuesta C.G., Castillo J.G., Sanz M.L., Oehling A. "Basophil degranulation test in house dust mite allergy: diagnostic value"  
Allergol et Immunopathol, 1989; 17: 193
- 22.- Fink J.N. "Hypersensitivity pneumonitis". In: Allergy Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F. (eds.). Mosby, St. Louis, 1983; pág. 1085
- 23.- Frugoni C. In: Alergia Clínica. Hansen K., Werner M., Ed. Salvat, Barcelona, 1970; 586
- 24.- Gleich G.J., Larson J.B. "Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST". J. Allergy Clin. Immunol. 1974; 58: 113
- 25.- Irañeta S.G., Duschak V., Seoane M.A., Alonso A. "Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts" J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1999; 9: 235-40
- 26.- King C. "The isolation and characterization of a novel collagenolytic serin protease allergen from the dust mite" J. Allergy Clin. Immunol. 1996; 98: 739-47
- 27.- Kradin R.L., Divertie M.B. "Usual interstitial pneumonitis is a T-cell alveolitis". Clin. Immunol. Immunopathol., 1986; 40: 224
- 28.- Laemmli U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature, 1970; 227: 680
- 29.- Ouchterlony O. "Diffusion in gel methods for immunological analysis". Progr. Allergy,



1958; 5:1

30.- Ovary Z. "Immediate reactions of the skin of experimental animals provoked by antigen-antibody interaction". *Progr. Allergy* 1958; 5: 459

31.- Pick E. "Biology of lymphokines". Vol. 60. Academic Press, New York, 1979; 119

32.- Reinhart M.P., Malamud D. "Protein transfer from isoelectrofocusing gels: the native blot". *Anal. Biochem.*, 1982; 123: 229

33.- Richerson H.B. "Hypersensitivity pneumonitis. Pathology and pathogenesis". *Clin. Rev. Allergy*, 1983; 1: 469

34.- Rohr A.S., Marshal N.A., Saxon A. "Successfull immunotherapy for *Triatoma protracta* induced anaphylaxis". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 73: 369

35.- Salvaggio J.E. "Hypersensitivity pneumonitis". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1987; 79: 558

36.- Towbin H., Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979; 9: 4350

37.- Upadrashta B. "T-cell localization in rabbit models of acute and chronic experimental hypersensitivity pneumonitis". *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 81: 821

38.- Voorhost R., Spieskma F. "Is a mite (*Dermatophagoides* sp) the producer of the house dust allergen?". *Allergy Asthma*, 1964; 10: 329

39.- Alonso A., Potenza M., Crespo O., Rodríguez S. : "Las proteasas de los insectos como inductoras de hipersensibilidad en los humanos," *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 2003; 232: 23-39.

40.- Alonso A., Potenza M., Mouchian K., Albónico J., Pionetti C. : "Proteinase and gelatinolytic properties of a *Triatoma infestans* extract." *Allergol et Immunopathol.*, 2004 ; 32 (4) ,223-227.

41.- Alonso A., Albónico J., Rodríguez S., Mouchián K., Scavini L. : "Cross reactivity between the antigens of *Periplaneta americana* and *Triatoma infestans*." *J.Invest. Allergol.Clin.Immunol.*, 1996; 6 : 301-306.

+++++\*\*\*\*\*+++++



ANCBA 2020